

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**COORDENADORIA ESPECIAL EM FARMACOLOGIA**

**LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**CARACTERÍSTICAS COMPORTAMENTAIS DE RATOS SHR E LEWIS  
RELACIONADAS À ANSIEDADE E AO CONSUMO DE ÁLCOOL APÓS  
SITUAÇÕES DE ESTRESSE**

**Gilliard Lach**

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Thereza C. M. de Lima**

Florianópolis, Fevereiro de 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**COORDENADORIA ESPECIAL EM FARMACOLOGIA**

**LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**CARACTERÍSTICAS COMPORTAMENTAIS DE RATOS SHR E LEWIS  
RELACIONADAS À ANSIEDADE E AO CONSUMO DE ÁLCOOL APÓS  
SITUAÇÕES DE ESTRESSE**

**Gilliard Lach**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre ao Curso de Pós-  
graduação em Farmacologia da Universidade  
Federal de Santa Catarina.

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Thereza C. M. de Lima**

Florianópolis, Fevereiro de 2007

*“Para achar água é preciso descer terra adentro, encharcar-se  
no lodo.*

*Mas há os que preferem olhar os céus,  
e esperar pelas chuvas...”*

Oduvaldo Viana Filho

## **AGRADECIMENTOS**

- Aos meus familiares, pelo apoio incondicional em todos os momentos.
- À Profa. Dra. Thereza C. M. de Lima pela amizade e por ter acreditado em um desconhecido para trabalhar em seu laboratório, dando início a minha carreira científica e pela orientação dedicada a este trabalho.
- Ao colegas de laboratório atuais ou antigos: Alexandre, Ana, Cristiane, Dirk, Filipe, Laísa, Lígia, Marcelo, Rafaela, Rebeca, Aline, Elaine, Fernanda e Maiara, pela amizade, conselhos e/ou contribuições ao trabalho.
- Aos amigos e amigas criados durante estes dois anos na Farmacologia, em especial, a Elayne, por sua visão crítica e por ter me ajudado em parte dos experimentos.
- Aos professores do curso de Pós-Graduação em Farmacologia por terem contribuído para minha formação e aos funcionários deste Departamento, por sempre estarem a disposição.
- Aos professores Drs. André Ramos, Aldo Lucion e ao também colega Rui Daniel Prediger por terem aceito o convite para participarem da avaliação deste trabalho e contribuir com melhorias para o mesmo.
- Aos atuais colegas e amigos de apartamento, Gustavo, Rafael e Murilo e aos antigos, Rimenez, Leonardo, Fabrício e Guilherme, pela amizade e os bons momentos de diversão.
- Aos animais, que para o bem da ciência contribuíram com o seu comportamento.
- A CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram com este trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ansiedade.....	1
1.2 Estresse.....	2
1.3 Labirinto em Cruz Elevado.....	4
1.4 Estresse & Ansiedade.....	5
1.5 Álcool.....	7
1.6 Álcool & Estresse.....	9
1.7 Uso de linhagens isogênicas.....	10
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Considerações éticas.....	16
3.2 Animais.....	16
3.3 Drogas.....	17
3.4 Testes comportamentais.....	17
3.5 Procedimentos de Estresse.....	19
3.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Efeito dos Protocolos de Estresse em Machos e Fêmeas das Linhagens SHR e	

LEW Avaliadas no LCE.....	24
4.2 Descrição dos Resultados.....	25
4.2.1 Estresse de Imobilização aguda (IMOB-2h).....	25
4.2.2 Estresse de imobilização repetida (IMOB-10d).....	27
4.2.3 Estresse variado de 10 dias (VARI-10d).....	29
4.2.4 Estresse variado e moderado de 28 dias (VARIm-28d).....	31
4.3 Influência dos Estressores sobre a Re-exposição ao LCE.....	33
4.4 Descrição dos Resultados.....	34
4.4.1 Estresse de imobilização aguda (IMOB-2h).....	34
4.4.2 Estresse de imobilização repetida por 10 dias (IMOB-10d).....	38
4.4.3 Estresse variado de 10 dias (VARI-10d).....	42
4.4.4 Estresse variado e moderado por 28 dias (VARIm-28d).....	46
4.5 Efeitos dos Estressores no Consumo de e/ou Preferência por Etanol.....	49
4.6 Descrição dos Resultados.....	50
4.6.1 Estresse de imobilização de 10 dias (IMOB-10d).....	50
4.6.2 Estresse variado de 10 dias (VARI-10d).....	52
4.6.3 Estresse variado e moderado (VARIm-28d).....	54
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## LISTA DE ABREVIACÕES

%TAB – Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos

%AB – Porcentagem de Entrada nos Braços Abertos

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

ANOVA – Análise de Variância

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animal

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

DA – Dopamina

FE – Entradas nos Braços Fechados

GABA – Ácido Amino-Butírico

HPA – Hipotálamo-Pituitário-Adrenal

IMOB-2h – Imobilização Aguda

IMOB-10d – Imobilização Repetida

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

LEW – ratos Lewis

SBNeC – Sociedade Brasileira de Neurociências Comportamental

SHR – *Spontaneously Hypertensive Rats*

SNC – Sistema Nervoso Central

TDAH – Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

VARI-10d – Estresse Variado

VARIm-28d – Estresse Variado e Moderado

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Influência do estresse IMOB-2h no comportamento de ratos LEW e SHR de ambos os sexos avaliados no LCE.

**Figura 2** – Influência do estresse IMOB-10d no comportamento de ratos LEW e SHR de ambos os sexos avaliados no LCE.

**Figura 3** – Influência do estresse VARI-10d no comportamento de ratos Lewis e SHR de ambos os sexos avaliados no LCE.

**Figura 4** – Influência do estresse VARIm-28d no comportamento de ratos LEW e SHR de ambos os sexos avaliados no LCE.

**Figura 5** – Efeito da re-exposição ao LCE em machos submetidos ao protocolo de estresse IMOB-2h.

**Figura 6** – Efeito da re-exposição ao LCE em fêmeas submetidas ao protocolo de estresse IMOB-2h.

**Figura 7** – Efeito da re-exposição ao LCE de machos submetidos ao protocolo de estresse IMOB-10d.

**Figura 8** – Efeito da re-exposição ao LCE em fêmeas submetidos ao protocolo de estresse IMOB-10d.

**Figura 9** – Efeito da re-exposição ao LCE de machos submetidos ao protocolo de estresse VARI-10d.

**Figura 10** – Efeito da re-exposição ao LCE em fêmeas submetidos ao protocolo de estresse VARI-10d.

**Figura 11** – Efeito da re-exposição ao LCE em machos submetidos ao protocolo de estresse VARIm-28d.

**Figura 12** – Efeito da re-exposição ao LCE em fêmeas submetidos ao protocolo de estresse VARIm-28d.

**Figura 13** – Consumo e preferência de álcool a 10% (v/v) por 12 dias consecutivos após a submissão ao estresse IMOB-10d em ratos LEW e SHR de ambos os sexos.

**Figura 14** – Consumo e preferência de álcool a 10% (v/v) por 12 dias consecutivos após a submissão ao estresse VARI-10d em ratos SHR e LEW de ambos os sexos.

**Figura 15** – Consumo e preferência de álcool a 10% (v/v) por 12 dias consecutivos após a submissão ao estresse VARIm-28d em ratos LEW e SHR.



## RESUMO

O estresse provoca diversas alterações neurobiológicas, endócrinas e comportamentais que nem sempre são percebidas por todos os indivíduos da mesma intensidade, talvez por influência de fatores genéticos. Para estudarmos a inter-relação dos fatores genético e ambiental no comportamento, fizemos uso de duas linhagens isogênicas contrastantes para ansiedade e consumo de álcool (LEW e SHR). Estas linhagens foram submetidas a quatro protocolos de estresse com características distintas de estresse: imobilização única (IMOB-2h), imobilização repetida (IMOB-10d), variado severo (VARI-10d) e variado moderado e prolongado (VARIm-28d) e, posteriormente, testadas para verificar o nível de ansiedade (inata e condicionada) no modelo do labirinto em cruz elevado (LCE). Os mesmos estressores, exceto o IMOB-2h, foram utilizados para verificar o consumo de álcool destes roedores. Nossos resultados indicaram que o IMOB-10d e o VARI-10d promoveram alterações do tipo ansiogênico sendo que o IMOB-10d apareceu de modo mais pronunciado em ambas as linhagens e sexo. A re-exposição ao LCE não promoveu aumento da ansiedade nos animais previamente estressado pelo IMOB-10d e em SHR fêmeas previamente estressada nos demais protocolos. Em contraste com os dados obtidos no LCE, um aumento do consumo de álcool foi observado nos animais submetidos ao VARIm-28d em SHR machos sugerindo que o mesmo protocolo de estresse é capaz de promover alterações de comportamento distintas, dependendo do protocolo pós estresse. Com isso, ficou demonstrado que características relacionadas à ansiedade parecem não determinar o grau de consumo de álcool já que o uso de linhagens mais ‘ansiosas’ e protocolos de estresse que promovem estados elevados de ansiedade não foram capazes de elevar o consumo de etanol.

## **ABSTRACT**

Stress situations provoke neurobiological, endocrine and behavioral changes that not always are perceived for all people perhaps in the same way maybe due to genetic influences. To study the relationship of the genetic factors and the environment (stress situation) in the behavior, we have used two contrasting inbred strains of rats for anxiety and in the alcohol consumption (Lewis and SHR rats). These strains had been submitted to four different stress protocols with distinct stress characteristics: acute immobilization (IMOB-2h), predictable immobilization (IMOB-10d), variable and severe stress (VARI-10d) and variable, moderate and chronic stress, and later tested to verify the level of anxiety (innate and conditioned) in the elevated plus maze (EPM). Our results indicate that the IMOB-10d and the VARI-10d promote anxiogenic-like alterations but the IMOB-10d produced a bigger alteration than VARI-10d in both male and females. The re-exposition to the EPM did not promote an increase of the anxiety level in animals when they were earlier stressed by the IMOB-10d and in the stressed females SHR by any protocol. In contrast with our results in the EPM, an increase of alcohol consumption were observed in the rodents submitted on VARI-28d stress protocol but only in male SHR suggesting that the same stress protocol is capable of promote distinct alteration depending of the protocol after a stress situation. In conclusion, we have demonstrated that the anxiety-like characteristic apparently do not determine the degree of alcohol consumption once the use of more 'anxious' rodent strain and several stress protocols that promote enhanced anxiety state did not increase of alcohol consumption.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Ansiedade**

A ansiedade é um dos sentimentos mais experimentados pela espécie humana e aflige o homem desde a mais remota antiguidade. A ansiedade tem sido descrita como um estado emocional de grande valor adaptativo, que é experimentado de maneira subjetiva como não prazeroso e desconfortável, cuja expressão plena envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivas (Graeff, 1984; Pratt, 1992). Sendo a ansiedade um tipo de emoção, não é surpreendente que as estruturas cerebrais envolvidas pertençam ao sistema límbico. Diversas estruturas desse sistema têm sido descritas como implicadas na regulação da ansiedade, incluindo o sistema septo-hipocampal (Gray, 1987), o hipotálamo (Schmitt et al., 1986), a matéria cinzenta periaquedutal (Graeff, 1994), o colículo inferior (Melo et al., 1992; Brandão et al., 1993) e, principalmente, a amígdala (Hodges et al., 1987; Tomaz et al., 1993; Graeff, 1994). A amígdala é composta por muitos núcleos que são reciprocamente conectados com o hipotálamo e a formação hipocampal e há várias evidências de que estados emocionais aprendidos, como o medo e a ansiedade, tenham seu influxo sensorial através dos seus núcleos basolaterais (Davis, 1992; LeDoux, 1994).

Os núcleos basolaterais da amígdala recebem informações sensoriais da formação hipocampal e as projetam para o núcleo central (responsável pela expressão das respostas emocionais provocadas por estímulos aversivos). Danos aos núcleos centrais ou basolaterais de animais de laboratório reduzem ou até mesmo eliminam uma grande variedade de comportamentos emocionais e respostas fisiológicas, tornando-os sem medo frente a situações antes aversivas, deixando-os mais dóceis quando manipulados (Carlson, 2002). Em contrapartida, quando a amígdala central é estimulada, o animal apresenta sinais comportamentais e fisiológicos relacionados ao medo e agitação.

A amígdala, especialmente os núcleos basolaterais, contém uma alta concentração de receptores benzodiazepínicos. A infusão de drogas ansiolíticas (da classe dos benzodiazepínicos) na amígdala reduz tanto a aprendizagem, quanto a expressão de respostas emocionais em animais de laboratório (Davis, 1992).

## **1.2 Estresse**

Estresse pode ser definido como um evento ambiental que altera a homeostasia do organismo, evocando uma cascata de respostas fisiológicas, comportamentais e psicológicas que podem ser adaptativas se ocorrerem de maneira moderada e não continuada (Selye, 1936). No entanto, está bem reconhecido que eventos estressantes, dependendo da intensidade, frequência, e de outros fatores, também estão implicados na etiologia e fisiopatologia de uma ampla variedade de doenças psiquiátricas incluindo a ansiedade, a depressão e o abuso de drogas, particularmente em indivíduos vulneráveis (Starkman et al., 1992, 1999; Sinhá, 2001; Nestler et al, 2002; de Kloet et al., 2005). No entanto, muitos desses efeitos prejudiciais são resultantes não dos estímulos em si, mas das reações a eles.

Quando um indivíduo está em uma situação ameaçadora, é requerida uma atividade vigorosa, onde as respostas autonômicas e endócrinas ajudam o indivíduo a mobilizar recursos energéticos do corpo. Neste caso, a divisão simpática do sistema nervoso autônomo está ativa e as glândulas adrenais secretam adrenalina, noradrenalina e hormônios esteróides do estresse. A adrenalina afeta o metabolismo da glicose, tornando os estoques de nutrientes dos músculos disponíveis para o fornecimento da energia necessária durante exercícios exaustivos. Junto com a noradrenalina, a adrenalina também aumenta o fluxo sanguíneo para os músculos, aumentando o débito cardíaco, acarretando um conseqüente aumento da pressão arterial e, a longo prazo, doenças cardiovasculares. Além de funcionar como um hormônio do estresse, a noradrenalina é um neurotransmissor e alguns estudos mostraram que situações estressantes

aumentam a liberação de noradrenalina no hipotálamo, córtex frontal e prosencéfalo (Yokoo et al., 1990; Cenci et al., 1992). Por outro lado, a destruição de axônios noradrenérgicos que partem do tronco encefálico para o prosencéfalo, impede o aumento da pressão arterial, situação geralmente produzida pelo estresse (Montero et al., 1990).

Quanto ao eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), na presença de um agente estressor, o núcleo paraventricular do hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a hipófise (anteriormente denominada pituitária). Em resposta ao CRH, a hipófise secreta o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que atinge as glândulas adrenais, via corrente sanguínea, e estimula a secreção de glicocorticóides (cortisol em humanos; corticosterona, em roedores) que são os efetores finais do eixo-HPA (de Kloet et al., 2005).

Os glicocorticóides exercem um importante papel na regulação da atividade basal do eixo HPA, assim como no término da resposta de estresse. O *feedback* negativo dos glicocorticóides na secreção de CRH e ACTH tem a função de limitar a duração da resposta de estresse. Em geral, a resposta de estresse e a ativação do eixo HPA devem ser de curta duração, pois a ativação crônica desse sistema pode levar a uma série de distúrbios que resultam da secreção prolongada e/ou aumentada de CRH e/ou de glicocorticóides (Charmandari et al., 2005). A exposição prolongada ao estresse e/ou glicocorticóides provoca a destruição de neurônios da formação hipocampal (Sapolski, 1986; Uno et al., 1989; Magarinos & McEwen, 1995; McEwen, 1999). Outra estrutura límbica, a amígdala, que tem um papel chave no medo e ansiedade, também está envolvida na regulação do eixo HPA (Allen & Allen, 1974; Davis, 1992; Davis et al., 1994; LeDoux, 1994). Diferentemente do que ocorre com o hipocampo, estudos semelhantes com estresse têm mostrado um aumento da arborização dendrítica em neurônios da amígdala (Vyas et al., 2002).

### **1.3 Labirinto em cruz elevado (LCE)**

O LCE, que consiste de um labirinto em forma de cruz com quatro braços, sendo dois abertos e dois fechados (com paredes), é um dos testes comportamentais de ansiedade mais utilizados, havendo mais de 2500 trabalhos publicados com o uso deste equipamento (Bertoglio & Carobrez, 2006). O LCE se baseia aversão natural de roedores por espaços abertos (Treit et al., 1993). Assim, quando um rato é exposto ao LCE pela primeira vez, eles apresentam sinais de conflito, de esquiva e fuga, sendo que o animal considerado mais “ansioso” vai menos vezes e permanece por menos tempo nos braços abertos, além de reduzir comportamentos de avaliação de risco (Rodgers & Cole, 1994). Esta esquiva dos braços abertos é diminuída através da administração de drogas ansiolíticas (clordiazepóxido, etanol) e aumentada por drogas consideradas ansiogênicas (escopolamina, flumazenil) (Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1992; Handley & McBlane, 1993; Rodgers & Cole, 1994).

Neste aparato, pode-se realizar uma segunda exposição dos ratos algumas horas ou dias da primeira exposição. Nestes casos, observar-se normalmente um grande aumento na esquiva dos braços abertos do LCE, sugerindo uma tendência ansiogênica (Rodgers et al., 1992; Rodgers & Shepherd, 1993; Treit, 1993). No entanto, ainda não se sabe ao certo qual é o estímulo responsável pela redução de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos na segunda exposição ao LCE. Gonzáles & File (1997) sugeriram que este fenômeno se deveria pela liberação de agonistas inversos endógenos que se ligariam e alterariam a conformação dos sítios de ligação nos receptores benzodiazepínicos. Isto poderia significar que uma exposição prévia, sem droga, no LCE induz uma mudança qualitativa na reação de medo/ansiedade, de uma resposta incondicionada, ou ansiedade inata, para uma resposta fóbica adquirida na segunda exposição (File & Zangrossi, 1993; Holmes & Rodgers, 1998; Rodgers et al., 1996; Treit, 1993). Por sua vez, Bertoglio & Carobrez (2000) sugerem em seu estudo que é necessário que os ratos conheçam tanto os braços abertos quanto os braços

fechados do aparato, para que eles adquiram medo dos braços abertos. Com isso, a consolidação da ansiedade durante a segunda exposição representaria uma forma de estado de condicionado pela experiência aversiva da primeira exposição. Novamente, o núcleo basolateral da amígdala tem um importante papel na consolidação de experiências aversivas, podendo modular a ansiedade da primeira para a segunda exposição (Vyas & Chattarji, 2004). Vários autores têm sugerido que o estresse induz mudanças do estado emocional do indivíduo similares ao observado após o rato passar pela primeira vez ao LCE, e que estas mudanças partiriam de uma cascata de eventos da amígdala culminando em uma remodelação dendrítica da porção basolateral o que provocaria facilitação do medo e ansiedade em ratos (LeDoux, 1994; File et al., 1998; Adamec et al., 1999; Vyas et al., 2002; Pawlak et al., 2003).

#### **1.4 Estresse & Ansiedade**

O estresse prolongado e/ou intenso pode causar alterações morfológicas e funcionais no cérebro (McEwen & Sapolsky, 1995; McEwen, 1999) e contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento de psicopatologias afetivas como a depressão e a ansiedade (Checkley, 1996; McEwen, 2002).

Diversos modelos animais foram desenvolvidos para um melhor entendimento dos efeitos do estresse prolongado no desenvolvimento de psicopatologias, sendo que o estresse de retenção por vários dias, parece ser um dos mais eficazes, além de bastante utilizado (Perrot-Sinal et al., 2004). Embora, de uma maneira geral, o efeito dos protocolos de estresse nos prejuízos de processos de aprendizado e memória esteja bem documentado (Bowman et al., 2003), menos atenção tem sido dada aos efeitos do estresse prolongado no comportamento emocional. Enquanto alguns trabalhos sugerem que a exposição de ratos a situações estressantes por um período prolongado, principalmente à imobilização repetida, aumenta o comportamento emocional, causando um estado ansiogênico no animal (Conrad et al, 1999;

Sandi et al., 2001; Beck & Luine, 2002; Vyas et al., 2002; Wood et al., 2003), outros trabalhos não conseguem confirmar esta hipótese (Faraday, 2002), sendo assim necessários mais estudos para esclarecer este assunto. Uma possível explicação para as diferenças nos resultados obtidos em vários laboratórios é o fato de não existir um protocolo de estresse padrão, mas sim protocolos que variam em vários aspectos (severidade, tempo e repetições, por exemplo).

Enquanto a plasticidade hipocampal (atrofia neuronal) parece mediar os aspectos cognitivos causados pelo estresse, mudanças no complexo amigdalóide provavelmente contribuem para os transtornos afetivos decorrentes do estresse (LeDoux, 1994; Shors & Mathew, 1998; Adamec et al, 1999). Como já sabemos, a amígdala exerce um papel crucial no processamento de vários tipos de emoções como o medo e a ansiedade (Rogan & LeDoux, 1996). O envolvimento da amígdala com situações de estresse promovendo aumento da emoção se dá de duas maneiras. Primeiro, dependendo da forma como a amígdala interpreta as informações (ameaças) oriundas do meio, o eixo HPA pode, ou não, ser ativado e desencadear as reações ao estresse. Segundo, os núcleos amígdalóides contêm receptores esteróides e, portanto, podem influenciar na resposta da amígdala em relação à ameaça do meio (LeDoux, 1994). Por estes motivos, a amígdala é de extrema importância nas respostas ao estresse.

Eventos como potencialização de longo prazo e plasticidade neuronal têm sido observados em animais sob condições de medo, sugerindo que o desenvolvimento desta emoção envolve mecanismos de aprendizagem. Além disso, a exposição de um rato ao estresse causa remodelação neuronal na amígdala, especificamente na porção basolateral (Vyas et al., 2002). Trabalhos posteriores a este último identificaram marcadores moleculares implicados na remodelação neuronal, que são ativados por estresse (Pawlak et al., 2003; Cordero et al., 2005). Entretanto, os efeitos provocados pelo estresse no cérebro são



dependentes do tipo de estressor utilizado (Vyas et al, 2002) e a hipertrofia amigdalар persiste por várias semanas depois da submissão ao último estressor (Vyas et al., 2004). Além disso, a amígdala também é importante para a consolidação da ansiedade na re-exposição ao LCE, e em um trabalho de Vyas & Chattarji (2004) envolvendo situações de estresse (estresse de imobilização repetida e estresse variado, ambos com 10 dias de duração), eles verificaram que apenas ratos Wistar submetidos ao estresse variado e não ao estresse de imobilização repetida (considerada mais severa) apresentaram redução de entradas e tempo de permanência nos braços abertos na re-exposição ao LCE. Isso poderia ser explicado pela aversividade do estresse de imobilização repetida, que produziria um estado do tipo ansiogênico elevado na primeira exposição, não possibilitando mais uma redução do nível de medo/ansiedade experimentado. Confirmando a hipótese acima, o mesmo grupo verificou em Wistar fêmeas que elas não eram afetadas por nenhum dos estresses utilizado. Já na re-exposição todos os grupos tiveram redução de entradas e de tempo nos braços abertos, quando comparados à primeira exposição (Mitra et al., 2005).

### **1.5 Álcool**

Talvez por suas propriedades farmacológicas e facilidade de obtenção, esta seja uma das drogas mais consumidas atualmente, estando inserida nas mais diferentes culturas, sendo que, apesar da vasta aceitação mundial, o consumo de etanol não é isento de danos ao indivíduo. O alcoolismo e suas conseqüências (patologias psíquicas e somáticas, além da dependência) têm uma etiologia complexa, onde variáveis farmacológicas, genéticas e ambientais estão bem estabelecidas em humanos e em animais de laboratório (Cloninger, 1987; Crabbe, 1999; Foroud e Li, 1999; Terenina-Rigaldie et al, 2003a; Terenina-Rigaldie et al, 2003b).

Uma das abordagens acerca da vulnerabilidade ao efeito do etanol mais extensivamente estudada é aquela que a coloca como a causa central do abuso/dependência. Esta linha de investigação tenta identificar efeitos comportamentais (ansiolítico ou estimulante, dependendo da dose) (Gingras e Cools, 1996; Bertoglio e Carobrez, 2002) e neurobiológicos (aumento extracelular de dopamina no sistema mesolímbico; Imperato e Di Chiara, 1986; Weiss et al, 1993; Koob e LeMoal, 1997; Nestler e Aghajanian, 1997) que seriam responsáveis por estas propriedades, que poderiam levar o indivíduo do uso à dependência (Nestler, 1992).

Uma outra visão, que leva em consideração o fato do etanol ser um depressor do SNC através da facilitação da abertura dos canais de cloreto acoplados aos receptores GABA (que acaba resultando em um decréscimo de tensão e inibição da ansiedade) é aquela que considera as características apresentadas pelo indivíduo como fator de vulnerabilidade ao abuso e dependência de drogas (Piazza e Le Moal, 1996). Em sua revisão, Cappell e Herman (1972) descrevem a hipótese de redução de tensão que prediz que indivíduos normalmente ansiosos ou estressados (em um estado sem droga), são mais sensíveis aos efeitos ansiolíticos do etanol e, portanto, mostram uma maior predisposição para consumirem esta droga.

Entretanto, a relação entre ansiedade e consumo de etanol em modelos experimentais é altamente controversa. Alguns estudos mostram uma correlação positiva entre a ansiedade experimental e um maior consumo de etanol, sugerindo uma ligação genética entre elas (Colombo et al., 1995; Vendrusculo et al., 2006), enquanto outros trabalhos, não menos importantes, concluem não haver relação entre o estado ansioso do indivíduo e a sua preferência pelo álcool (Terenina-Rigaldie et al., 2002; Fernandez-Teruel et al., 2002; Henniger et al., 2002; Da Silva et al., 2004).

### 1.6 Estresse & álcool

Diversos trabalhos vêm documentando a importância de situações estressantes na motivação ao abuso de drogas (Russell & Mehrabian, 1975; Koob & Le Moal, 1997) e várias hipóteses têm sido formuladas. O estresse aumenta a liberação de dopamina (DA) no núcleo *accumbens* (estrutura chave nos processos motivacionais e de reforço produzido por drogas de abuso), um efeito que tende a ser reduzido quando se bloqueia a liberação de glicocorticóides (Piazza et al, 1996).

A liberação de glicocorticóides pelo estresse e suas ações no sistema dopaminérgico mesolímbico leva a neuroadaptações que conferem aos indivíduos uma maior suscetibilidade aos futuros efeitos de drogas de abuso. O estresse parece também favorecer a auto-administração de drogas em animais e humanos (Kalivas e Stewart, 1991; Piazza e Le Moal, 1998; Goeders, 2002) e a recorrência destes eventos pode promover aumento significativo gradativo e duradouro na liberação de DA em áreas mesocorticolímbicas (Kalivas e Stewart, 1991). A liberação de DA induzida por drogas também é aumentada em indivíduos estressados (Kalivas e Stewart, 1991). Além disso, os indivíduos dependentes de drogas frequentemente exibem padrões anormais de atividade do eixo HPA (Mello e Mendelson, 1997).

O estresse também facilita a aquisição do consumo de álcool e pode induzir um aumento na ingestão de álcool durante a manutenção de seu consumo (Pohorecky, 1990), possivelmente via liberação de corticóides (Fahlke e Hansen, 1999). Esta correlação entre estresse e dependência parece ocorrer com uma ampla variedade de drogas com potencial de abuso (Piazza & Le Moal, 1998). Em estudos com ratos, constatou-se que a sensibilidade à cocaína pode ser correlacionada positivamente com o aumento de corticosterona plasmática induzida pelo estresse (Goeders e Guerin, 1996; Goeders, 2002), achado similar ao encontrado em humanos usuários de cocaína, que têm a secreção de cortisol aumentada (Mello &

Mendelson, 1997). No entanto, em ratos adrenalectomizados ou com a síntese de corticosterona inibida, os efeitos comportamentais de drogas de abuso são atenuados (Rouge-Pont et al, 1995; Prasad et al, 1998).

Pesquisadores vêm postulando hipóteses no sentido de integrar a participação do estresse na vulnerabilidade à dependência. Koob e Le Moal (2001) verificaram que em indivíduos não dependentes o impacto de estressores seria adequado à situação, as experiências de reforço também seriam normais e os circuitos cerebrais relacionados à liberação dos hormônios do estresse (cortisol/corticosterona) não estariam ativados. No entanto, durante a transição para dependência, tanto o sistema de reforço como o de estresse estariam ativados e o indivíduo começaria a experimentar as sensações emocionais negativas da abstinência da droga. Entretanto, na dependência, o sistema de reforço estaria em um estado de sub-ativação, enquanto que os sistemas cerebrais do estresse e das respostas emocionais estariam ativados demasiadamente, facilitando o abuso de drogas (Koob e Le Moal, 2001).

Schuckit (1994) demonstrou que indivíduos com baixa sensibilidade aos efeitos subjetivos do etanol (isto é, que precisavam de doses maiores para obter os efeitos), apresentavam risco cerca de 75% maior de se tornarem dependentes de álcool. Além disso, indivíduos mais sensíveis ao estresse, podem ser mais propensos ao uso de drogas de abuso. Por outro lado, algumas evidências sugerem que o aumento da vulnerabilidade ao abuso de drogas, depende do tipo de estresse vivenciado pelo indivíduo (Sinha, 2001).

### **1.7 Uso de Linhagens Isogênicas**

O uso de modelos animais na pesquisa básica tem proporcionado uma ampliação do conhecimento na área da biologia humana, apontando a importância da influência de fatores genéticos e ambientais no comportamento e no desenvolvimento neurobiológico. Entretanto,

não há modelo animal perfeito, completo e abrangente o suficiente para modelar os mais variados aspectos envolvidos em algum tipo específico de transtorno psiquiátrico como a ansiedade (van der Staay, 2006). Por este motivo, debates contraditórios sobre a validade e a utilidade de modelos animais específicos ainda persistem. No entanto, o estudo de populações extremas (ou claramente contrastantes em comportamentos, por exemplo) em relação a traços de interesse pode trazer uma maior contribuição à compreensão de processos psicopatológicos (Trullas & Skolnick, 1993).

O uso de linhagens isogênicas que são produzidas por cruzamentos sucessivos entre irmãos e irmãs ou progenitores e descendentes, parece promissor para o estudo de populações extremas, pois cada linhagem geralmente possui características comportamentais e neuroquímicas que lhes parece peculiar. Com aproximadamente 20 gerações por endocruzamento, os indivíduos de uma mesma linhagem apresentam mais de 98% de homozigose, podendo ser considerados isogênicos. As vantagens de utilizar estes animais é que as diferenças fenotípicas encontradas entre indivíduos de uma mesma linhagem podem ser consideradas de origem ambiental, devido à sua alta homogeneidade genotípica. Sendo assim, as diferenças entre populações de linhagens isogênicas diferentes, mantidas sob as mesmas condições ambientais, podem ser consideradas de origem genética.

Em 1997, em um trabalho fundamental nesta área, Ramos e colaboradores, a partir de um estudo com seis linhagens isogênicas de ratos, propuseram um novo modelo genético para o estudo da ansiedade. Este modelo era composto de duas linhagens de ratos, Lewis (LEW) e ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats* - SHR), contrastantes em comportamentos relacionados a este transtorno em humanos. Neste trabalho, os pesquisadores demonstraram que a linhagem SHR possuía características do tipo ansiolítica e a linhagem LEW, do tipo ansiogênica, quando submetidas a vários testes comportamentais de ansiedade ou emocionalidade como o labirinto em cruz elevado, campo aberto, caixa claro/escuro e

interação social, confirmando a importância do fator genético nas respostas comportamentais em situações aversivas.

Originada através de cruzamentos consangüíneos de ratos da linhagem Wistar, realizados pelo Dr. Lewis (que deu nome à linhagem), os ratos LEW são frequentemente usados como modelo de doenças autoimunes (Stohr et al, 1999, Castro et al, 2006). Esta vulnerabilidade a doenças autoimunes decorre principalmente da baixa reatividade do eixo HPA (Glowa et al, 1992). Assim, os ratos LEW têm sido usados para avaliar a influência genética na resposta imune, regulação do eixo-HPA (Calogero et al, 1992; Sternberg et al, 1992; Armário et al., 1995), distúrbios afetivos e de ansiedade (Berton et al., 1998; Ramos et al, 1998; Hinojosa et al, 2005) e, até mesmo, na dependência a drogas, tais como cocaína, morfina e etanol (Suzuki et al, 1988a; 1988b; Kosten et al, 1994), pois os ratos LEW parecem ter uma alta propensão ao abuso de drogas (Camp et al, 1994) embora nestes casos, os ratos LEW não foram comparados com SHR. Quando ratos LEW foram comparados com SHR, a linhagem LEW consumiu menos etanol em testes de auto-administração (Da Silva et al., 2004; 2005; Izídio, 2005).

Por outro lado, a linhagem SHR foi originalmente selecionada para o estudo da hipertensão essencial humana por Okamoto & Aoki (1963), a partir do cruzamento de um macho Wistar que exibia pressão arterial muito elevada (“hipertensão espontânea”) com uma fêmea também Wistar com pressão arterial um pouco acima da média. Além das alterações cardiovasculares, diversos estudos têm descrito diferenças significativas no perfil comportamental dos animais SHR em relação a linhagens normotensas. Esta linhagem foi proposta como modelo para o estudo do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Sagvolden et al., 1992; Sagvolden et al., 1993; Mormède et al, 2002; Fujita et al., 2003) e para distúrbios de aprendizado e memória (Meneses & Hong, 1998). Levando-se em consideração que a memória e a ansiedade são fenômenos intimamente relacionados (LeDoux

& Muller, 1997), Calzavara e colaboradores (2004) sugeriram um importante papel dos níveis de ansiedade dos animais SHR em seu desempenho na esQUIVA discriminativa no LCE (um modelo comportamental que avalia simultaneamente o aprendizado, a memória e comportamento relacionados à ansiedade).

Em estudos utilizando testes animais de depressão, os ratos SHR exibiram um menor tempo de imobilidade (perfil “anti-depressivo”), comparando-se com ratos LEW (Berton et al., 1998; Hinojosa et al, 2005). Animais SHR também apresentam respostas comportamentais de medo/ansiedade reduzidas (independente do sexo) nos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, interação social e medo condicionado (Gentsch et al.,1987; Goto et al., 1993); Ramos et al., 1997, 2002). Desta forma, seria razoável supor que as alterações comportamentais observadas nestas linhagens, LEW e SHR, pudessem ser decorrentes da hipertensão observada nesta última. Entretanto, uma população F<sub>2</sub> originária de um cruzamento entre as linhagens LEW e SHR, mostrou que a pressão arterial não está associada aos comportamentos relacionados à ansiedade nestas linhagens (Ramos et al, 1998). Curiosamente, em outro estudo, apenas animais SHR adultos (e não jovens de 45 dias) apresentaram aumento do tempo de exploração nos braços abertos do LCE, quando comparados com Wistar (Calzavara et al., 2004).

Diferentemente do que ocorre aos ratos LEW, que apresentam uma hiporesponsividade no eixo HPA, os ratos SHR exibem um aumento maior e mais prolongado nos níveis de adrenalina e noradrenalina, uma maior liberação de corticosterona e também um maior aumento na frequência cardíaca e pressão sangüínea em resposta a situações estressantes, quando comparados a outras linhagens de ratos, inclusive a LEW (Kirby et al, 1989; Hendley e Ohlsson, 1991; Armario et al, 1995).

Em todos estes casos, ansiedade *versus* estresse, e ansiedade *versus* consumo de álcool *versus* estresse, parece ocorrer, ao menos em parte, a influência de fatores genéticos para que essas diferenças interindividuais ocorram (Lesch, 2001; Hiroi & Agatsuma, 2005). Além disso, diferenças entre sexo também ocorrem na ansiedade e no consumo de etanol. Com isso, a inter-relação entre estes aspectos merece, portanto, ser melhor investigada em populações distintas (linhagem LEW e SHR), que reajam de forma diferente a estes fatores.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

- O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência de fatores estressantes e sua interação com fatores genéticos em medidas comportamentais relacionadas à ansiedade e a possível influência destes no consumo/preferência de álcool.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar os efeitos comportamentais produzidos por diferentes protocolos de estresse em animais de ambos os sexos das linhagens SHR e LEW avaliados no labirinto em cruz elevado.
- Avaliar os efeitos comportamentais provocados pelos diferentes estressores na re-exposição ao LCE nas duas linhagens.
- Analisar os efeitos dos diferentes estressores no consumo/preferência de álcool e sua eventual relação com os níveis de ansiedade experimental destas linhagens.

### **3. MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais delineados de maneira tal que o sofrimento dos animais utilizados fosse minimizado. Procuramos usar um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e extrair o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos, de acordo com os procedimentos éticos internacionais e nacionais estabelecidos na Assembléia Geral da SBNeC – Caxambu (1992). Os procedimentos aqui realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (#23080.027554/2004-49/UFSC).

#### **3.2 ANIMAIS**

A colônia dos ratos SHR utilizada neste estudo é originária da Universidade de Harvard (Boston, MA, EUA), sendo obtida a partir da UNESP (Botucatu, SP, Brasil). A linhagem LEW utilizada é originária da *Harlan Spreague Dowley Inc*, (Indianápolis, IN, EUA), sendo obtida a partir da UNICAMP (Campinas, SP, Brasil) pelo Laboratório de Genética do Comportamento, cujas matrizes foram gentilmente cedidas e reproduzidas em nosso laboratório sob um sistema de acasalamento irmão/irmã, como recomendado para todas as linhagens consanguíneas.

Os animais foram desmamados e separados por sexo com quatro semanas de idade e, após isso, foram mantidos em gaiolas de plástico coletivas (42 x 24 x 17 cm) com, no máximo, seis ratos por caixa. Todos os animais foram mantidos sob um o ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz ligada das 07:00 às 19h), com temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e água e ração *ad libitum*. Os animais foram usados entre 11 e 13 semanas de idade na época dos experimentos

### **3.3 DROGAS**

Foi utilizada solução alcoólica 10% (v/v) elaborada com água a partir de álcool absoluto 99,5% p.a. (Nuclear).

### **3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS**

#### **3.4.1 Labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi baseado no modelo validado por Pellow (1985) e consiste de dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) e dois fechados (50 x 10 cm), também opostos, de acrílico transparente (Anseloni et al., 1995). Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (10x 10 cm). A plataforma e o assoalho são de acrílico preto, enquanto que as paredes laterais dos braços fechados, de 42 cm de altura, são de acrílico transparente. O aparelho está elevado a uma altura de 52 cm do nível do chão. Para evitar a queda dos animais dos braços abertos, esses foram circundados por 0,5 cm de acrílico transparente. O labirinto usado nos experimentos estava localizado numa sala com luz vermelha (15W) com luminosidade de 1 lux em todo o aparato. Após o teste de cada animal, o aparelho foi limpo com solução de etanol a 10%.

Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 min (Pellow et al., 1985). As medidas comportamentais registradas no LCE foram os parâmetros clássicos: frequência total de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. A frequência total de entradas foi obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados (para se considerar que o rato entrou no braço aberto ou fechado, ele deveria colocar as 4 patas e para sair, as 4 patas deveriam estar fora do braço aberto ou fechado). Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos a percentagem de entrada no braço aberto foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de

entradas, e esse índice foi multiplicada por 100. De maneira semelhante, foi calculada a percentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. O parâmetro etológico "imersões de cabeça desprotegida" também foi registrado neste modelo (considerou-se quando o rato imergia a cabeça abaixo da superfície dos braços abertos) (Rodgers et al., 1997). A exposição ao LCE ocorreu 24h após o último estressor. A reexposição ao LCE ocorreu 24h após a primeira exposição.

### **3.4.2 auto-administração de etanol**

Neste teste os animais permanecem isolados em caixas plásticas (21 x 28 x 19 cm) com grade metálica e chão coberto com maravalha. A caixa permitia que os animais tivessem movimentos livres e acesso *ad libitum* à ração e às duas garrafas de líquido. O protocolo de auto-administração, adaptado de Spanagel e colaboradores (1995), consistiu em 12 dias com a presença de duas garrafas com líquido, uma contendo água e outra contendo solução alcoólica 10%. O consumo de líquido (água ou álcool) foi medido a cada dois dias sempre a partir das 14h, através da pesagem das garrafas. No período da pesagem os animais permaneciam sem qualquer tipo de líquido para consumo. Sempre após a pesagem das garrafas, as mesmas eram cuidadosamente trocadas de lado para evitar qualquer tipo de efeito da posição. O peso dos animais foi medido três vezes durante o protocolo (dias 1, 6 e 12). Os dados estão apresentados sob a forma de consumo por peso do animal ( $\text{g de etanol} / 48\text{h} / 100\text{g do peso do animal}$ ), ou ainda de preferência do animal pela solução em relação ao consumo total de líquido ( $\text{consumo da solução} / \text{consumo total dos líquidos} \times 100$ ). O início do protocolo ocorreu 24h após o último estressor empregado.

### 3.5 PROCEDIMENTOS DE ESTRESSE

#### 3.5.1 Tipos de estressores

- Gaiola molhada = adição de 400mL de água à gaiola moradia do rato.
- Gaiola inclinada = inclinação da gaiola moradia, podendo variar de 30 ou 45°.
- Exposição ao barulho = uma rádio FM fora de sintonia.
- Pareamento = dois ratos do mesmo sexo/linhagem colocados na mesma caixa, sendo que os animais eram desconhecidos entre si.
- Luz contínua = interrupção do ciclo claro-escuro normal, deixando a luz acesa durante um período inteiro da fase escura.
- Inversão do ciclo de luz = realizada após a iluminação contínua, consiste em inverter o ciclo claro-escuro de 12h.
- Privação de ração = retirar toda a ração da gaiola moradia.
- Exposição à garrafa vazia = colocação de uma garrafa vazia, realizada logo após a privação de água.
- Luz estroboscópica = introdução de luz piscante no ciclo claro mas com luz ambiente apagada. Pode variar entre 150 e 300 piscadas por minuto.
- Isolamento = retirada dos animais das gaiolas coletivas e colocação em gaiolas individuais.
- Luz apagada = manutenção da luz apagada durante a fase clara do ciclo.
- Imobilização e imobilização no frio = colocação dos ratos em tubos plásticos perfurados (diâmetro de 16 cm para fêmeas ou 19 cm para machos), impossibilitando a movimentação dos animais e, depois, os tubos foram colocados na geladeira (4°C) no grupo de imobilização no frio.

- Nado forçado = colocação dos animais em cilindros de PVC contendo água. A temperatura da água variava entre 15 e 25° C.

**Tabela 1:** Estressores aplicados no protocolo de estresse variado.

<b>DIA</b>	<b>ESTRESSOR</b>	<b>DURAÇÃO</b>
<b>1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nado forçado 25°C</li> <li>• Isolamento</li> </ul>	4 min noite toda (12h)
<b>2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luz contínua</li> <li>• Privação água e ração</li> </ul>	noite toda noite toda
<b>3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luz apagada</li> <li>• Nado forçado 15°C</li> </ul>	3 h 3 min
<b>4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imobilização</li> <li>• Privação água e ração</li> </ul>	1 h noite toda
<b>5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caixa inclinada 30°</li> <li>• Luz apagada</li> </ul>	50 min 2 h
<b>6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imobilização</li> <li>• Luz contínua</li> </ul>	15 min noite toda
<b>7</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luz apagada</li> <li>• Privação água e ração</li> </ul>	3 h noite toda
<b>8</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imobilização no frio</li> <li>• Luz contínua</li> </ul>	1 h noite toda
<b>9</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caixa inclinada 30°</li> <li>• Isolamento</li> </ul>	5 h noite toda
<b>10</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imobilização no frio</li> <li>• Nado forçado 25°C</li> </ul>	15 min 4 min

### 3.5.2 Estresse de Imobilização Agudo (IMOB-2h)

Consistiu em expor os animais a um único estímulo estressante, a imobilização (início às 14h) com duração de 2h.

### **3.5.3 Estresse de Imobilização Repetido de 10 dias (IMOB-10d)**

O estresse de imobilização repetido consistia em expor os animais a um mesmo estímulo estressante (imobilização) sempre no mesmo horário (início às 9h) e com a mesma duração (2h) por 10 dias consecutivos (Vyas et al., 2002).

### **3.5.4 Estresse Variado de 10 dias (VARI-10d)**

Adaptado de Ortiz e colaboradores (1996), o protocolo de estresse variado consistiu em expor os animais a situações variadas e, às vezes, dependendo do estressor aplicado, severas de estímulos estressantes (tabela 1) por 10 dias consecutivos.

Os animais submetidos ao IMOB-10d e VARI-10d tiveram o mesmo grupo controle.

### **3.5.5 Estresse Variado e Moderado (VARIm-28d)**

Este protocolo foi adaptado tomando como base vários trabalhos da literatura (Willner et al., 1987; Bielajew et al., 2002; Papp et al., 2003; Bekris et al., 2005). Consistiu em expor os animais a situações moderadas e variadas de estímulos estressantes. Durante todo o protocolo, o grupo que estava sendo estressado permaneceu em gaiolas individuais e sem contato visual com outro animal. Para o grupo submetido ao consumo de etanol, o grupo controle também permaneceu isolado, mas mantendo contato visual com outros ratos. Um estressor de cada vez era aplicado aos animais. A ordem de estressores consta na tabela 2.

## **3.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

No primeiro bloco experimental, um total de 288 ratos LEW e SHR de ambos os sexos foram usados. Destes, 147 eram LEW (80 machos e 67 fêmeas) e 141 eram SHR (68 machos e 73 fêmeas). Os animais foram distribuídos ao acaso e submetidos a 4 protocolos de estresse (IMOB-2h, IMOB-10d, VARI-10d e VARIm-28d). Após a exposição dos estressores, os

animais tinham entre 11 e 13 semanas de idade e então, foram submetidos no LCE 24h após o último estressor. A análise estatística utilizada foi individualizada para cada situação de estresse com a ANOVA de uma via para verificar efeito de linhagem (LEW e SHR), e ANOVA de duas vias dentro de cada grupo de linhagem (LEW ou SHR) para verificar efeito de tratamento e de sexo. Havendo significância de  $p < 0,05$  o teste *post hoc* de Newmann Keuls foi efetuado.

**Tabela 2:** Estressores aplicados no protocolo de 28 dias

<b>DIA DA SEMANA</b>	<b>ESTRESSORES</b>		
<b>Segunda-feira</b>	Barulho (2h)	Luz estroboscópica 150ppm (3h)	Gaiola molhada (17h)*
<b>Terça-feira</b>	Privação ração (7h)	Gaiola inclinada 30° (17h)*	
<b>Quarta-feira</b>	Privação água e ração (7h)	Pareamento (17h)*	
<b>Quinta-feira</b>	Luz estroboscópica 300ppm (7h)	Privação de água (16h)*	
<b>Sexta-feira</b>	Garrafa vazia (1h)	Luz contínua (12h)	
<b>Sábado e Domingo</b>	Inversão de ciclo (48h)		

\* estressores que iniciavam em um dia e terminavam em outro.

No segundo bloco, os mesmos animais do primeiro bloco foram utilizados e re-testados 24h após no mesmo aparato. A análise estatística utilizada foi ANOVA de duas vias (linhagem e tratamento) com a inclusão de medidas repetidas (primeira e segunda exposição). Havendo significância igual a  $p < 0,05$  ou havendo tendência estatística (entre  $p = 0,05$  e  $p < 0,09$ ) com diferença visual clara nos gráficos, o teste *post hoc* de Newman Keuls foi efetuado.



No terceiro bloco experimental, um total de 174 ratos LEW e SHR de ambos os sexos foram usados. Destes, 94 eram LEW (45 machos e 49 fêmeas) e 80 SHR (40 machos e 40 fêmeas). Os animais foram distribuídos e submetidos a 3 protocolos de estresse (IMOB-10d, VARI-10d e VARIm-28d). Vinte e quatro horas após a exposição do último estressor, os animais tinham entre 10 e 12 semanas de idade e então, iniciaram o experimento de auto-administração de etanol. A análise estatística utilizada foi ANOVA de duas vias (linhagem e tratamento) com a inclusão de medidas repetidas (dias de consumo de etanol = 12 dias). Havendo significância ( $p < 0,05$ ) ou havendo tendência estatística ( $p = 0,05$  a  $p < 0,09$ ) com diferença visual clara nos gráficos, o teste *post hoc* foi efetuado.

O programa estatístico utilizado foi Statistica ® 6.0 e os gráficos foram elaborados pelo programa Prism ® 4.0.

## **4. RESULTADOS**

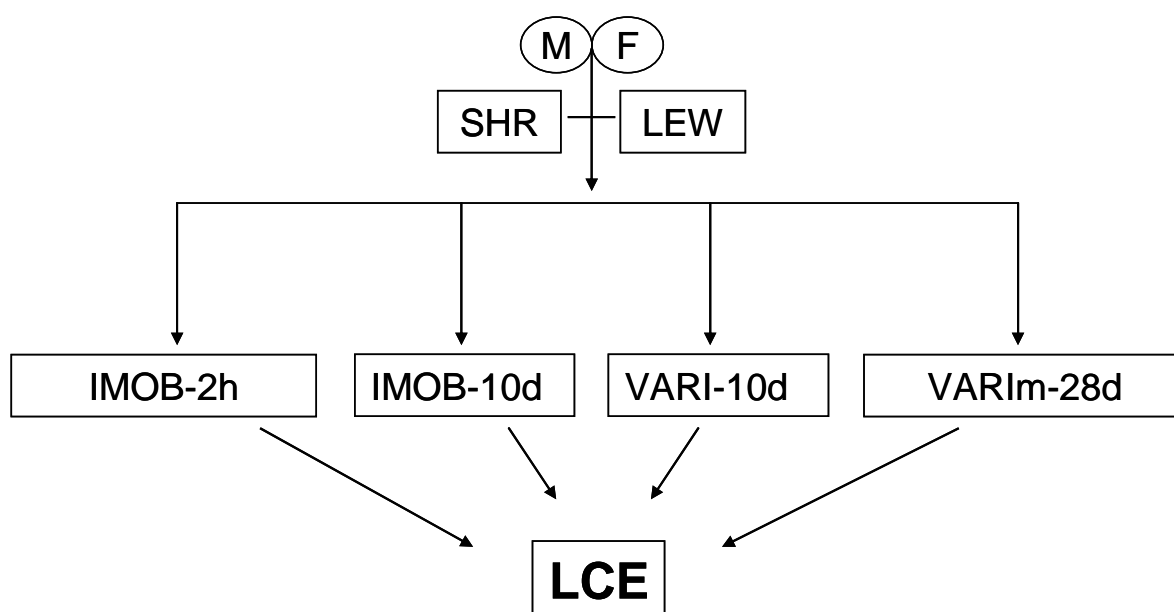
### **4.1 EFEITO DOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE EM MACHOS E FÊMEAS DAS LINHAGENS SHR E LEW AVALIADAS NO LCE**

#### **4.1.1 Objetivos específicos**

- Analisar o comportamento provocado pelos protocolos de estresse no LCE nas linhagens contrastantes para ansiedade.

#### **4.1.2 Delineamento**

Os animais foram submetidos ao protocolo de IMOB-2h, IMOB-10d, VARI-10d e VARIm-28d e, 24 h após o último estressor, seus comportamentos foram avaliados no LCE.



## 4.2 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

### 4.2.1 Estresse de Imobilização aguda (IMOB-2h)

Os resultados do IMOB-2h estão descritos na figura 1. No parâmetro porcentagem de tempo nos braços abertos, a ANOVA de uma via revelou um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=90,85$  e  $p<0,001$ ). Ao analisarmos cada linhagem independentemente, a ANOVA de duas vias não revelou efeito geral de tratamento e sexo em SHR, entretanto, um efeito geral de sexo foi observado em LEW (Fêmeas > Machos;  $F=7,25$  e  $p<0,05$ ). Para o parâmetro porcentagem de entrada nos braços abertos, a ANOVA de uma via revelou um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=29,35$  e  $p<0,001$ ). A ANOVA de duas vias dentro de cada linhagem não mostrou efeito geral de tratamento e sexo em ambas as linhagens. Foi observado para a medida de número de entradas nos braços fechados um efeito geral de linhagem (SHR < LEW;  $F=20,53$  e  $p<0,001$ ). Além disso, foi observado um efeito geral de sexo (Fêmeas > Machos;  $F=4,95$  e  $p<0,05$ ) em SHR, enquanto que em LEW, nenhum efeito foi observado. No parâmetro etológico imersões de cabeça desprotegida, a ANOVA de uma via revelou um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=19,67$  e  $p<0,001$ ). Dentro de cada linhagem, a ANOVA de duas vias não mostrou efeito geral de tratamento e sexo em SHR. O contrário ocorreu em LEW, onde um efeito geral de tratamento (Estressado < Controle;  $F=12,93$  e  $p<0,01$ ), de sexo (Fêmeas > Machos;  $F=8,86$  e  $p<0,01$ ) e uma interação tratamento e sexo ( $F=6,02$  e  $p<0,05$ ) foi observado.

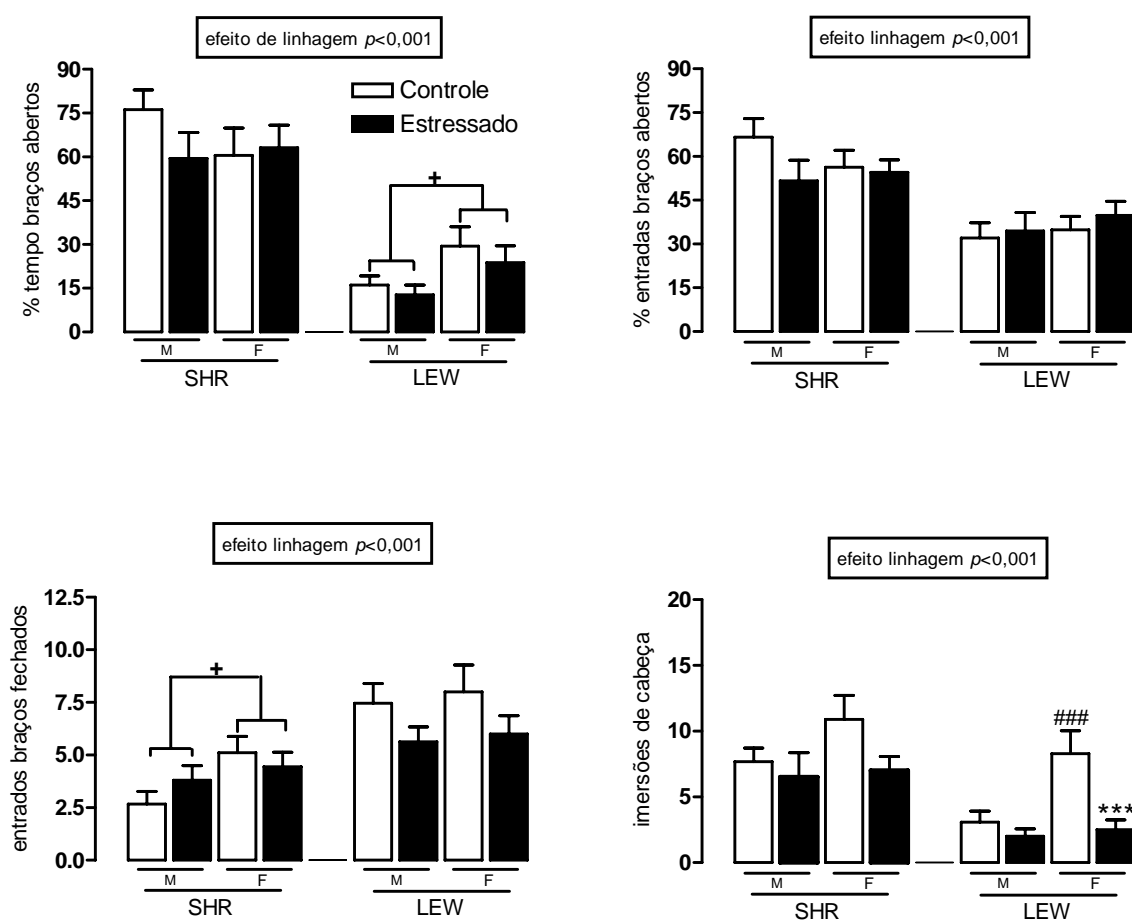


Figura 1 – Influência do estresse IMOB-2h no comportamento de ratos LEW e SHR de ambos os sexos avaliados no LCE. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam os e.p.m. (\*\*\*) $p < 0,001$  na comparação entre controle e estressado; + $p < 0,05$  na comparação entre machos e fêmeas; ### $p < 0,001$  na comparação entre macho e fêmea; ANOVA de duas vias). M = macho e F = fêmeas. Número de animais por grupo: SHR (M) = 9, 10; LEW (M) = 11, 11. SHR (F) = 9, 9; LEW (F) = 7, 8, controle e estressado, respectivamente.

#### 4.2.2 Estresse de imobilização repetida (IMOB-10d)

Os dados referentes ao estresse IMOB-10d estão representados na figura 2. A ANOVA de uma via revelou um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=27,54$  e  $p<0,001$ ) na % de tempo nos braços abertos. Dentro de cada linhagem, a ANOVA de duas vias revelou um efeito geral de tratamento em SHR e LEW (Estressado < Controle;  $F=10,32$  e  $p<0,01$  e  $F=17,16$  e  $p<0,001$ , respectivamente). No parâmetro % de entradas nos braços abertos, a ANOVA de uma via revelou um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=16,14$  e  $p<0,001$ ). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito geral de tratamento (Estressado < Controle;  $F=16,19$  e  $p<0,001$  em SHR e  $F=16,20$  e  $p<0,001$  em LEW). No parâmetro número de entradas nos braços fechados, a ANOVA de uma via indicou um efeito geral de linhagem (SHR < LEW;  $F=21,49$  e  $p<0,001$ ) e na análise dentro de cada linhagem, a ANOVA de duas vias revelou um efeito de tratamento em SHR (Estressado > Controle;  $F=8,96$  e  $p<0,01$ ) e de sexo em LEW (Fêmeas > Machos;  $F=11,99$  e  $p<0,01$ ). A ANOVA de uma via mostrou no parâmetro etológico imersões de cabeça um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=15,21$  e  $p<0,001$ ) enquanto a ANOVA de duas vias revelou, dentro de cada linhagem, um efeito geral de tratamento e sexo em animais SHR (Estressado < Controle;  $F=9,51$  e  $p<0,01$  e Fêmeas > Machos;  $F=6,28$  e  $p<0,05$ ) e apenas de tratamento em animais LEW (Controle > Estressado;  $F=16,78$  e  $p<0,001$ ).

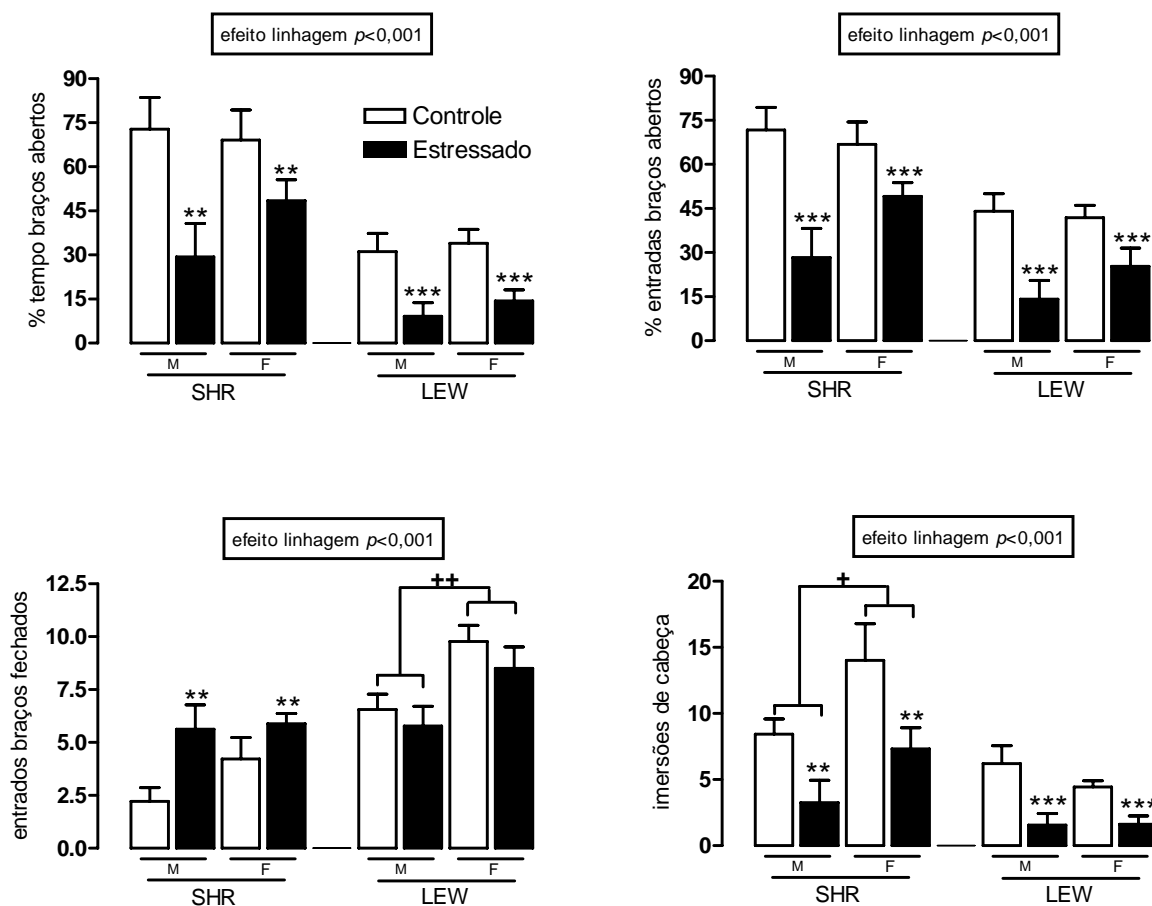


Figura 2 – Influência do estresse IMOB-10d no comportamento de ratos LEW e SHR de ambos os sexos avaliados no LCE. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam os e.p.m. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle; + $p < 0,05$ ; ++ $p < 0,01$  entre sexo; ANOVA de duas vias). M = macho e F = fêmeas. Número de animais por grupo: SHR (M) = 9,8; LEW (M) = 9,9. SHR (F) = 9,8; LEW (F) = 9,8, controle e estressado, respectivamente.

#### 4.2.3 Estresse variado de 10 dias (VARI-10d)

Os dados referentes ao VARI-10d estão representados na figura 3. A ANOVA de uma via no parâmetro porcentagem de tempo nos braços abertos revelou um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=26,36$  e  $p<0,001$ ). Uma ANOVA subsequente dentro de cada linhagem não revelou efeito significativo no tratamento e sexo em ambas as linhagens (SHR e LEW). Na porcentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA de uma via revelou novamente um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=11,31$  e  $p<0,01$ ) e a ANOVA de duas vias dentro de cada linhagem revelou somente um efeito geral de tratamento apenas na linhagem SHR (Controle > Estressado;  $F=6,80$  e  $p<0,05$ ). A ANOVA de uma via realizada no número de entradas nos braços fechados revelou um efeito geral de linhagem (SHR < LEW;  $F=67,79$  e  $p<0,001$ ) e a análise subsequente com a ANOVA de duas vias dentro de cada linhagem revelou um efeito geral de sexo tanto em SHR como em LEW (Fêmeas > Machos;  $F=4,17$  e  $p<0,05$ ;  $F=8,94$  e  $p<0,01$ , respectivamente). O número de imersões de cabeça desprotegida também sofreu um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=14,36$  e  $p<0,001$ ). Uma ANOVA de duas vias realizada posteriormente dentro de cada linhagem revelou um efeito geral de tratamento e sexo na linhagem SHR (Controle > Estressado;  $F=9,39$  e  $p<0,01$ ; Fêmeas > Machos;  $F=6,46$  e  $p<0,05$ , respectivamente). Já em LEW, apenas um efeito geral de tratamento foi observado (Estressado > Controle;  $F=9,43$  e  $p<0,01$ ). Em nenhuma análise, houve interação entre tratamento e sexo.

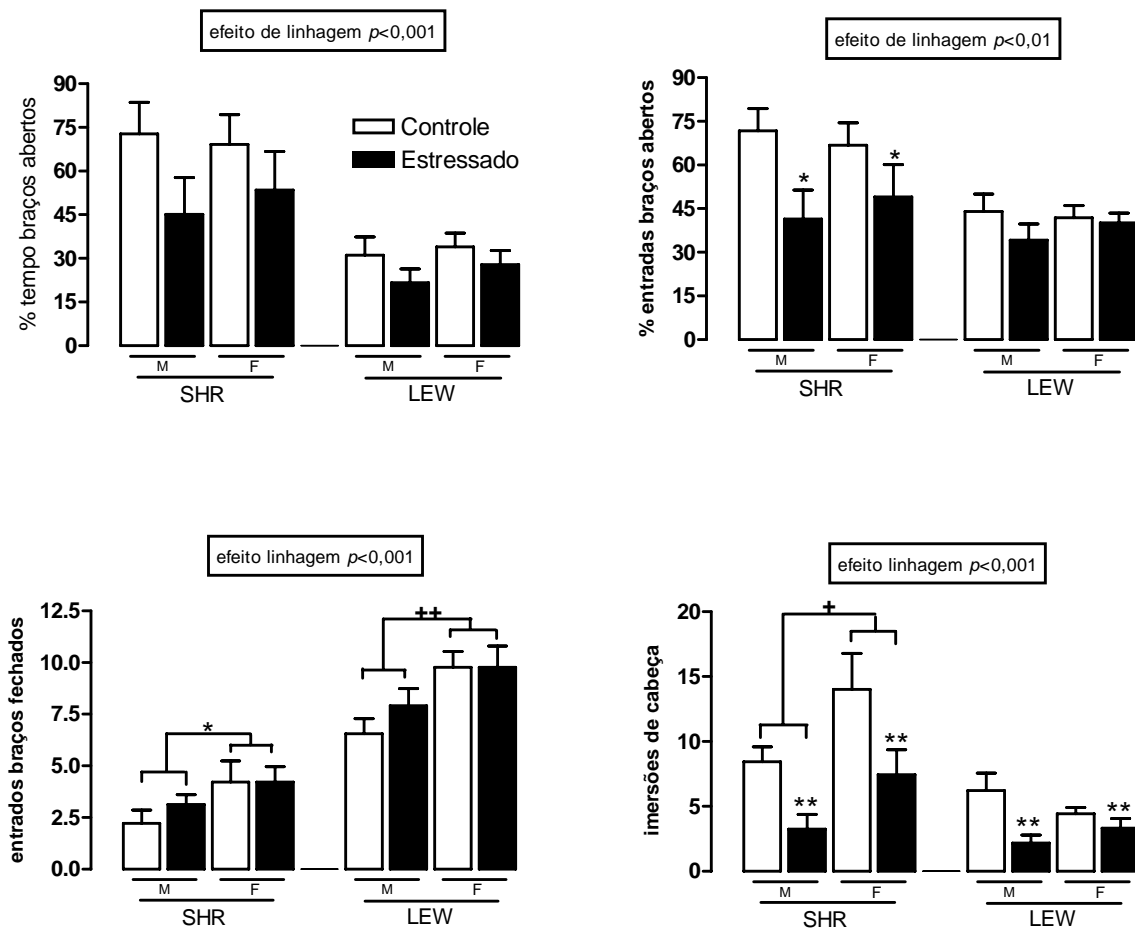


Figura 3 – Influência do estresse VARI-10d no comportamento de ratos Lewis e SHR de ambos os sexos avaliados no LCE. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam os e.p.m. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo controle; + $p < 0,05$ ; ++ $p < 0,01$  comparando macho e fêmeas; ANOVA de duas vias). M = macho e F = fêmeas. Número de animais por grupo: SHR (M) 9,8; LEW (M) 9,11. SHR (F) 9,9; LEW (F) 9,9, controle e estressado, respectivamente.



#### 4.2.4 Estresse variado e moderado de 28 dias (VARIm-28d)

Os dados referentes ao VARIm-28d estão mostrados na figura 4. Eles mostram, através de análise por ANOVA de uma via, que o VARIm-28d provocou um efeito geral de linhagem nos parâmetros porcentagem de tempo (SHR > LEW;  $F=89,21$  e  $p<0,001$ ) e de entradas nos braços abertos (SHR > LEW;  $F=43,11$  e  $p<0,001$ ). A análise posterior de ANOVA de duas vias dentro de cada grupo de linhagem não revelou qualquer efeito de tratamento ou sexo em ambas as linhagens. O número de entradas nos braços abertos teve um efeito geral de linhagem (SHR < LEW;  $F=32,13$  e  $p<0,001$ ) e a ANOVA subsequente de duas vias revelou efeitos significativos apenas na linhagem LEW (efeito de tratamento – Controle > Estressado;  $F=5,03$  e  $p<0,05$  e efeito de sexo – Fêmeas > Machos;  $F=22,08$  e  $p<0,001$ ). No último parâmetro analisado, imersões de cabeça desprotegida, a ANOVA de uma via revelou um efeito geral de tratamento (SHR > LEW;  $F=38,03$  e  $p<0,001$ ) e, em análise subsequente, a ANOVA de duas vias dentro de cada linhagem revelou um efeito geral de tratamento (Controle > Estressado;  $F=13,48$  e  $p<0,001$ ) e de sexo (Machos < Fêmeas;  $F=8,86$  e  $p<0,01$ ) apenas em animais SHR. Nenhuma interação entre tratamento e sexo foi observado nos animais experimentais.

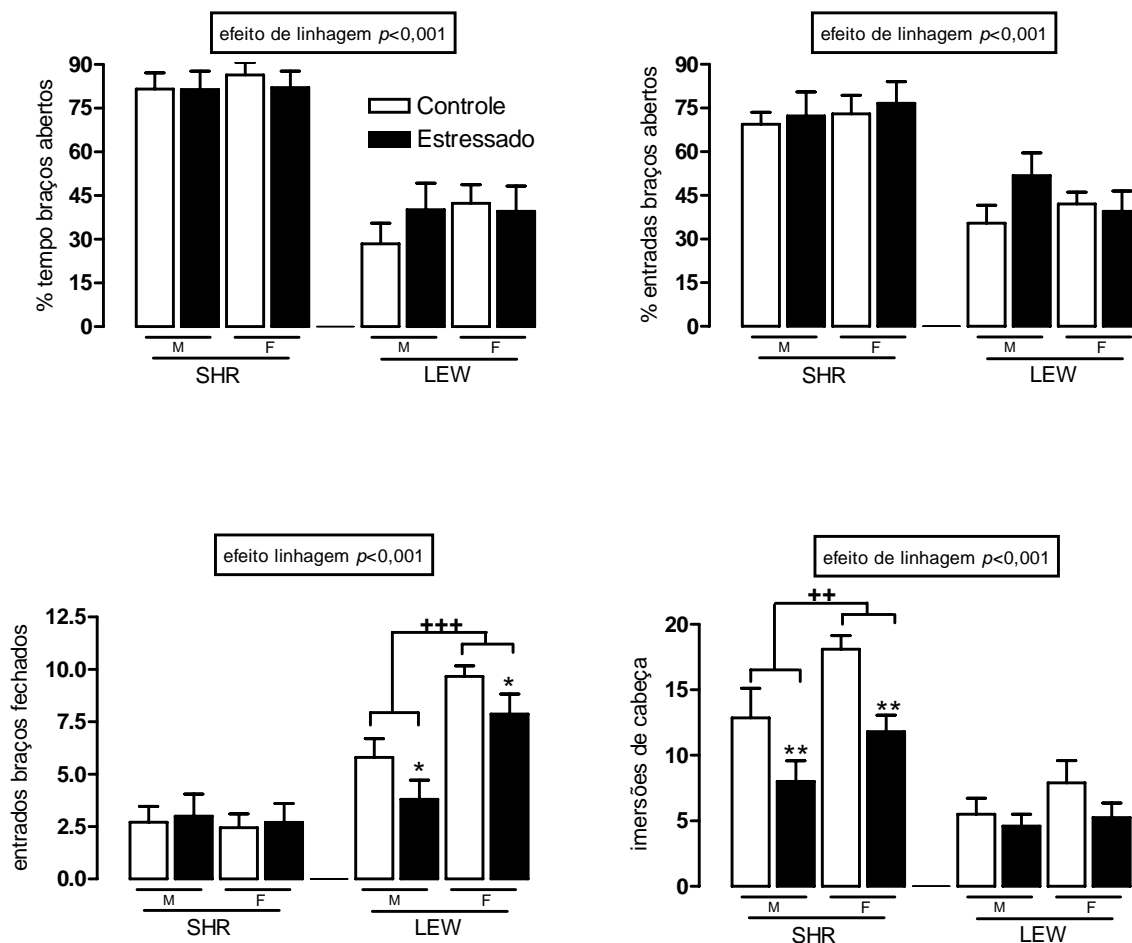


Figura 4 – Influência do estresse VARIm-28d no comportamento de ratos LEW e SHR de ambos os sexos avaliados no LCE. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam os e.p.m. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo controle; ++ $p < 0,01$ ; +++ $p < 0,001$  entre sexo; ANOVA de duas vias). M = macho e F = fêmeas. Número de animais por grupo: SHR (M) = 7,8; LEW (M) 10,10. SHR (F) 9,10; LEW (F) 9,8, controle e estressado, respectivamente.

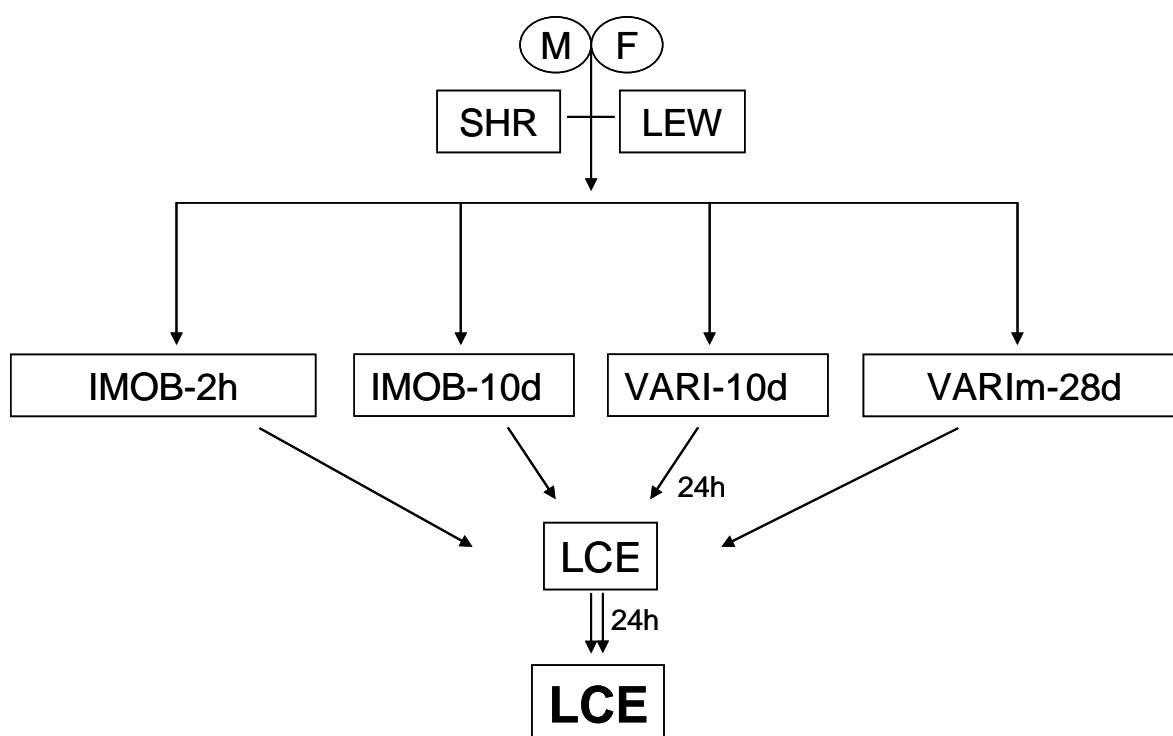
### 4.3 INFLUÊNCIA DOS ESTRESSORES SOBRE A RE-EXPOSIÇÃO AO LCE

#### 4.3.1 Objetivos específicos

- Verificar o efeito dos protocolos de estresse sobre a re-exposição ao LCE

#### 4.3.2 Delineamento

Os animais foram submetidos aos diferentes protocolos de estresse e 24 h após o último estressor, foram analisados no LCE. Após outras 24h, estes animais foram re-expostos ao LCE e seus dados comparados com a primeira exposição.



#### 4.4 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

##### 4.4.1 Estresse de imobilização aguda (IMOB-2h)

Os efeitos do IMOB-2h na re-exposição ao LCE estão mostrados nas figuras 5 (machos) e 6 (fêmeas). Em machos, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas nos mostrou que houve um efeito geral de linhagem ( $SHR > LEW$ ;  $F=90,44$  e  $p<0,001$ ) e repetição (Teste  $>$  Reteste;  $F=67,41$  e  $p<0,001$ ), além de uma interação entre linhagem e tratamento ( $F=17,64$  e  $p<0,001$ ), no parâmetro porcentagem de tempo nos braços abertos, indicando uma diminuição da permanência nos braços abertos em SHR e LEW quando expostos pela segunda vez ao LCE. No número de entradas nos braços abertos houve apenas um efeito geral de linhagem ( $SHR > LEW$ ;  $F=26,89$  e  $p<0,001$ ) e repetição (Teste  $>$  Reteste;  $F=50,00$  e  $p<0,001$ ). No parâmetro número de entradas nos braços fechados, apenas uma interação entre repetição e linhagem foi observada ( $F=22,55$  e  $p<0,001$ ), mostrando que SHR re-expostos ao LCE entram mais nos braços fechados. Já o número de imersões de cabeça teve um efeito geral em linhagem ( $SHR > LEW$ ;  $F=22,35$  e  $p<0,001$ ) e repetição (Teste  $>$  Reteste;  $F=39,00$  e  $p<0,001$ ), além de uma interação entre repetição e linhagem ( $F=4,29$  e  $p<0,05$ ).

Já em fêmeas, a porcentagem de tempo nos braços abertos teve um efeito geral de linhagem ( $SHR > LEW$ ;  $F=64,31$  e  $p<0,001$ ) e de repetição (Teste  $>$  Reteste;  $F=10,50$  e  $p<0,01$ ). Também foi observado uma tendência entre repetição e linhagem ( $F=3,35$  e  $p<0,08$ ) mostrando que apenas a linhagem LEW teve o tempo de permanência nos braços abertos diminuídos na segunda exposição ao LCE. No número de entradas nos braços abertos, um efeito geral de linhagem ( $SHR > LEW$ ;  $F=71,94$  e  $p<0,001$ ), repetição (Teste  $>$  Reteste;  $F=15,55$  e  $p<0,001$ ) e uma interação entre repetição e linhagem ( $F=12,69$  e  $p<0,01$ ) foi observado, sendo que a interação entre repetição e linhagem mostrou que apenas a linhagem LEW teve o comportamento alterado ao passar pela segunda vez ao LCE. O número de entradas nos braços fechados teve apenas um efeito geral de linhagem ( $SHR < LEW$ ;  $F=8,96$  e

$p < 0,01$ ). Já no número de imersões de cabeça, foi encontrado um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=22,50$  e  $p < 0,001$ ), um efeito geral de tratamento (Controle > Estressado;  $F=16,48$  e  $p < 0,001$ ) e um efeito geral de repetição (Teste > Reteste;  $F=23,57$  e  $p < 0,001$ ).

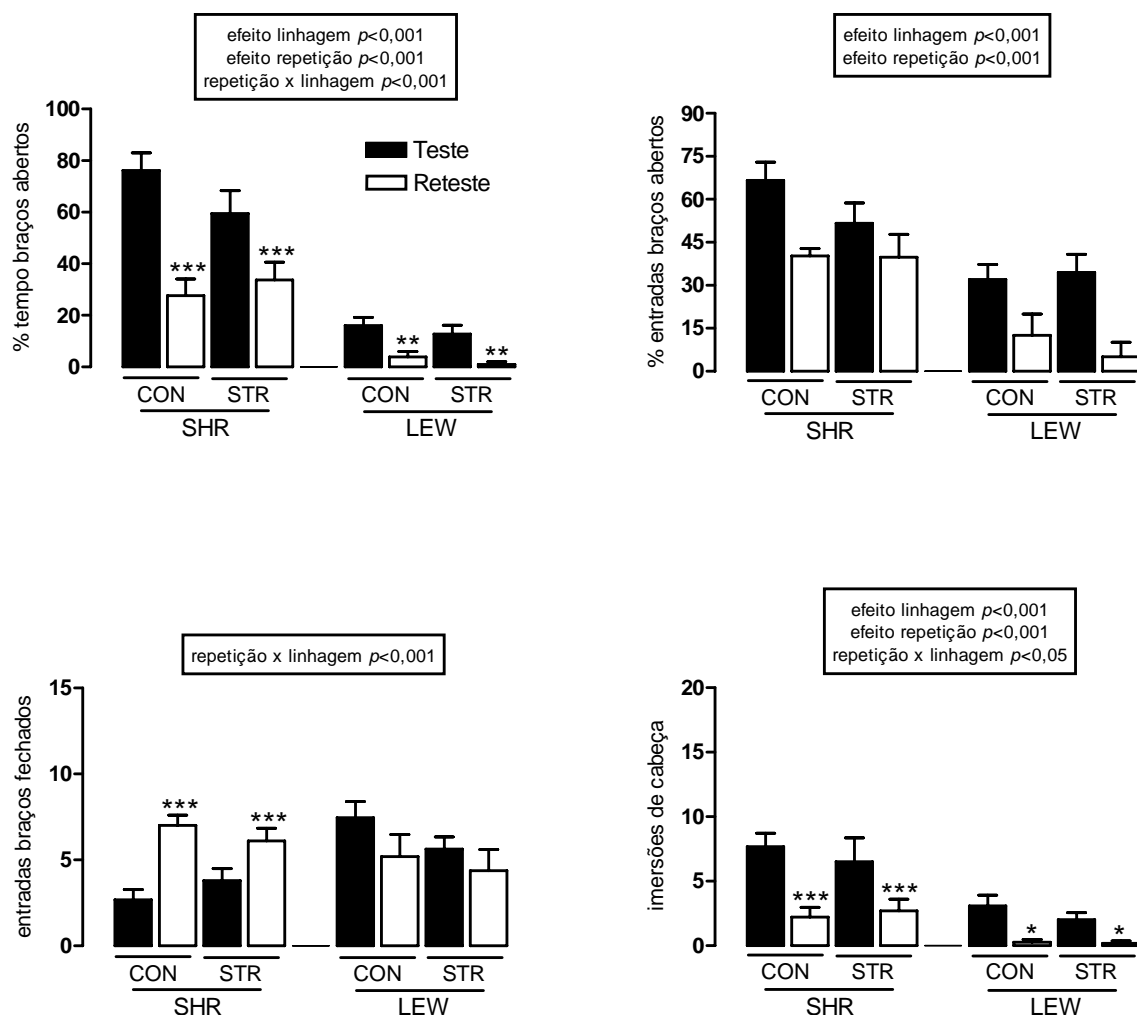


Figura 5 – Efeito da re-exposição ao LCE em ratos machos submetidos ao protocolo de estresse IMOB-2h. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam os e.p.m. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post hoc* Newman Keuls). Número de animais utilizados: SHR = 9,10 e LEW = 11,11, controle e estressado, respectivamente.

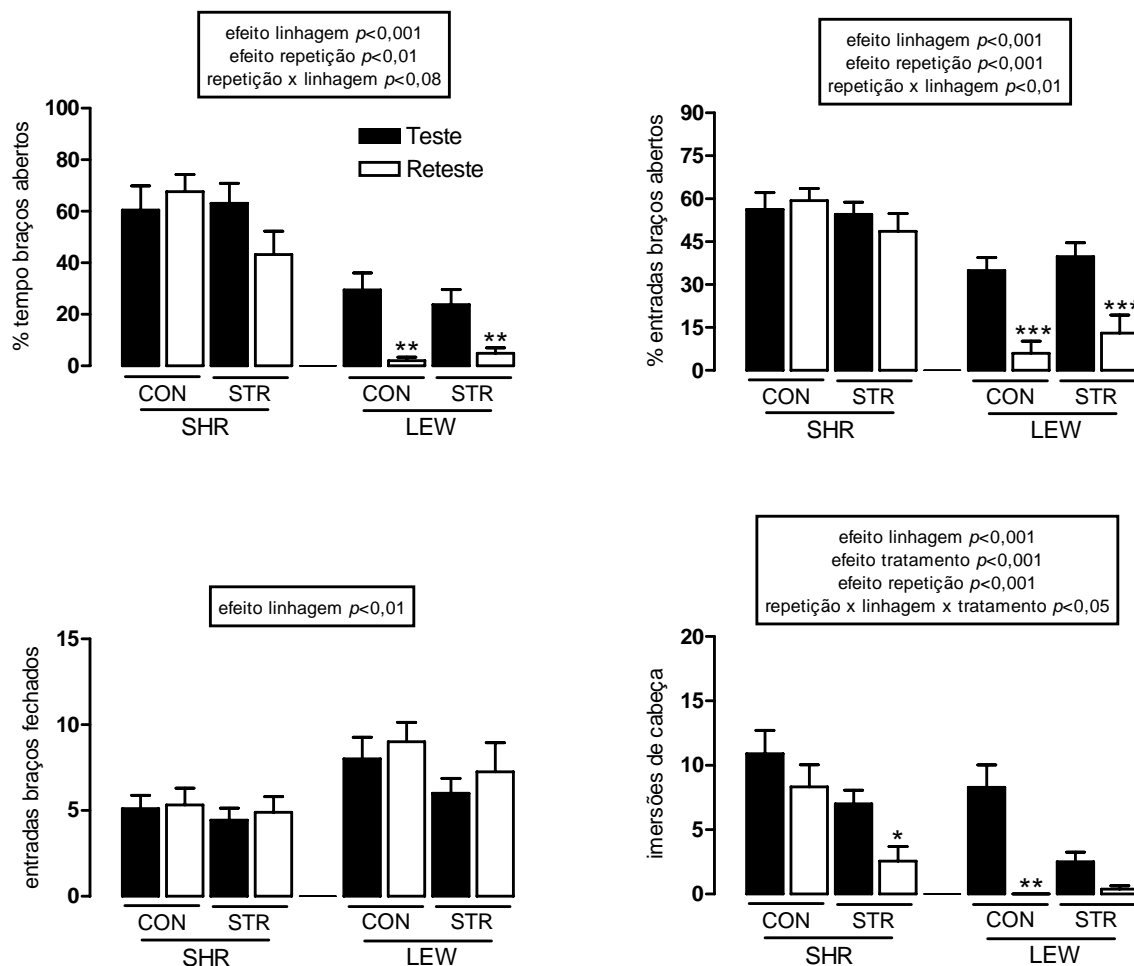


Figura 6 – Efeito da re-exposição ao LCE em fêmeas submetidas ao protocolo de estresse IMOB-2h. Cada coluna representa a porcentagem relativa aos 100% da primeira exposição e as barras verticais indicam os e.p.m. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação a primeira exposição; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post hoc* Newman Keuls). Número de animais utilizados: SHR=9,9 e LEW=7,8, para grupo controle e estressado, respectivamente.

#### 4.4.2 Estresse de imobilização repetida por 10 dias (IMOB-10d)

As figuras 7 e 8 apresentam os dados obtidos na re-exposição ao LCE de machos e fêmeas, respectivamente, que foram submetidos ao estresse IMOB-10d. Em machos, observou-se um efeito geral de linhagem ( $SHR > LEW$ ;  $F=17,53$  e  $p<0,001$ ), tratamento (Controle  $>$  Estressado;  $F=13,44$  e  $p<0,001$ ) e repetição (Teste  $>$  Reteste;  $F=26,92$  e  $p<0,001$ ) para porcentagem de tempo nos braços fechados, além de uma interação entre linhagem e tratamento ( $F=5,35$  e  $p<0,05$ ), mostrando que a linhagem SHR controle permanece mais tempo nos braços abertos do que SHR estressado. Além disso, uma interação entre repetição e tratamento ( $F=6,28$  e  $p<0,05$ ) revelou em teste *post hoc* que a re-exposição ao LCE promoveu efeito de redução de tempo nos braços abertos apenas em grupos controle. Em relação à porcentagem de entradas nos braços abertos, observou-se um efeito geral de linhagem ( $SHR > LEW$ ;  $F=10,63$  e  $p<0,01$ ), tratamento (Controle  $>$  Estressado;  $F=18,36$  e  $p<0,001$ ) e repetição (Teste  $>$  Reteste;  $F=21,67$  e  $p<0,001$ ). Também foram observadas interações entre linhagem e tratamento ( $F=4,54$  e  $p<0,05$ ), mostrando que a linhagem SHR controle vai mais aos braços abertos do que SHR estressado e uma interação entre repetição e tratamento ( $F=7,75$  e  $p<0,01$ ), indicando que a re-exposição ao LCE promoveu diminuição na porcentagem de entradas nos braços abertos apenas em grupos controle. No parâmetro número de entradas nos braços fechados, foi observado um efeito geral de linhagem ( $SHR < LEW$ ;  $F=5,47$  e  $p<0,05$ ), tratamento (Controle  $<$  Estressado;  $F=5,47$  e  $p<0,05$ ) e repetição (Teste  $<$  Reteste;  $F=4,27$  e  $p<0,05$ ), além de uma interação entre repetição, linhagem e tratamento ( $F=5,51$  e  $p<0,05$ ), sem qualquer significância estatística em testes *post hoc*. Já no parâmetro etológico número de imersões de cabeça, observou-se um efeito de linhagem ( $SHR > LEW$ ;  $F=6,73$  e  $p<0,05$ ), tratamento (Controle  $>$  Estressado;  $F=15,04$  e  $p<0,001$ ) e repetição (Teste  $>$  Reteste;  $F=26,53$  e  $p<0,001$ ), além de uma interação repetição e tratamento ( $F=7,18$  e  $p<0,05$ ), demonstrando que apenas os grupos controle tiveram uma redução das imersões de cabeça na re-exposição.



Já em fêmeas (figura 8), no parâmetro de porcentagem de tempo nos braços abertos, observou-se um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=34,31$  e  $p<0,001$ ), efeito geral de tratamento (Controle > Estressado;  $F=6,33$  e  $p<0,05$ ) e de repetição (Teste < Reteste;  $F=16,26$  e  $p<0,001$ ). Além disso, uma tendência na interação repetição, linhagem e tratamento ( $F=16,26$  e  $p<0,09$ ) onde se observou após teste *post hoc* que apenas o grupo SHR estressado e LEW controle tiveram o tempo de permanência nos braços abertos diminuídos após a primeira exposição ao LCE. No parâmetro número de entradas nos braços abertos também houve um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=41,65$  e  $p<0,001$ ), tratamento (Controle > Estressado;  $F=6,18$  e  $p<0,05$ ) e repetição (Teste > Reteste;  $F=7,64$  e  $p<0,01$ ). No número de entradas nos braços fechados, um efeito geral de linhagem foi observado (SHR < LEW;  $F=50,12$  e  $p<0,001$ ). Também se observou um efeito geral de repetição (Teste < Reteste;  $F=9,07$  e  $p<0,01$ ) e uma forte tendência na interação entre repetição e linhagem ( $F=3,82$  e  $p<0,06$ ), mostrando que apenas em animais LEW se observou um aumento nas entradas aos braços fechados na re-exposição. No número de imersões de cabeça, ocorreu um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=22,91$  e  $p<0,001$ ), tratamento (Controle > Estressado;  $F=5,16$  e  $p<0,05$ ) e de repetição (Teste > Estressado;  $F=13,01$  e  $p<0,01$ ). Além disso, uma tendência na interação entre repetição e tratamento mostrou, em teste *post hoc* ( $F=3,20$  e  $p<0,09$ ), que apenas nos grupos controle houve uma redução das imersões de cabeça quando os animais foram expostos pela segunda vez ao LCE.

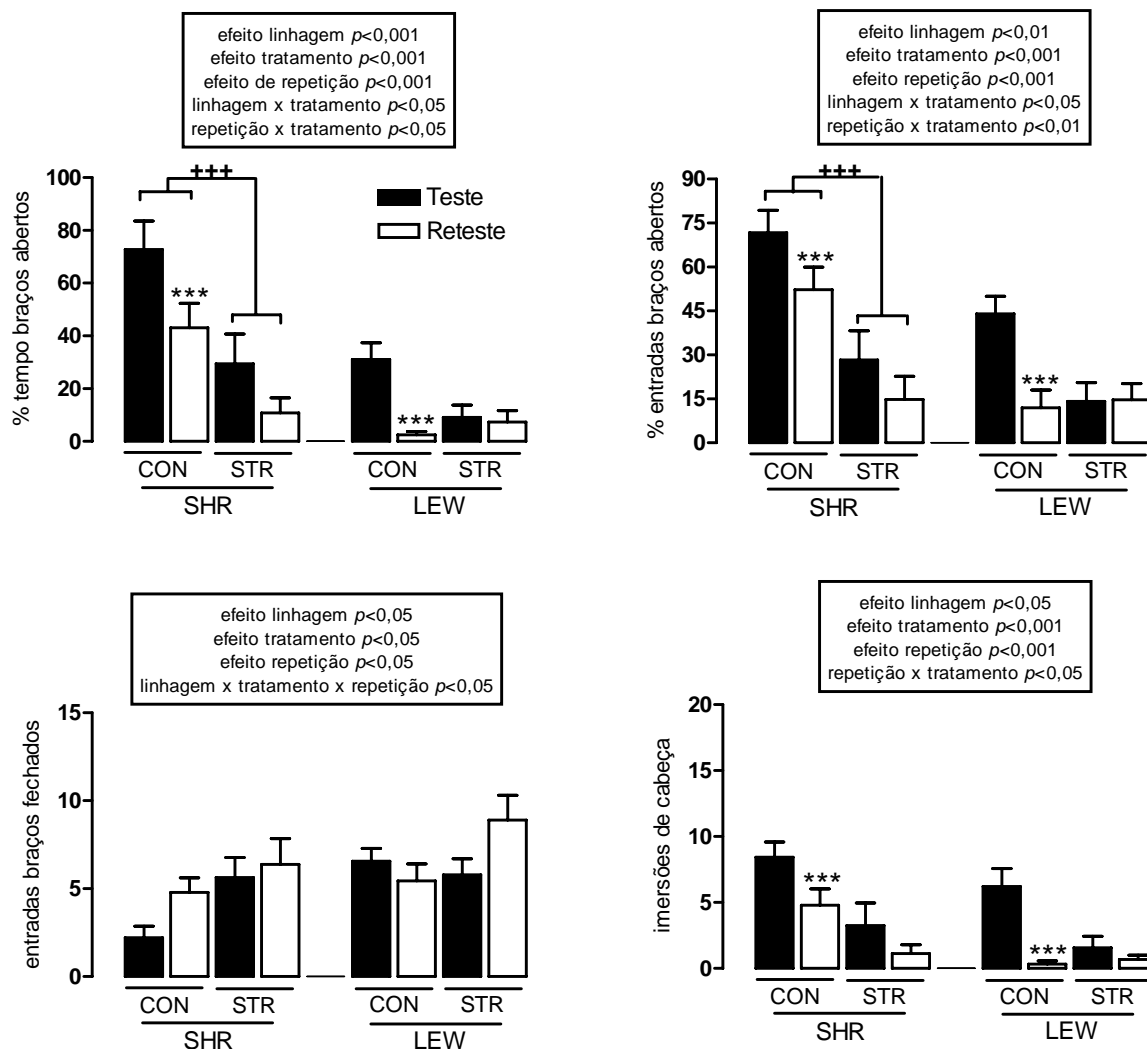


Figura 7 – Efeito da re-exposição ao LCE de ratos machos submetidos ao protocolo de estresse IMOB-10d. Cada coluna representa a média da primeira exposição e as barras verticais indicam os e.p.m. (\*\*\*)  $p < 0,001$  em relação a primeira exposição; +++  $p < 0,001$  entre controle e estressado; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida teste *post hoc* Newman Keuls). Número de animais utilizados: SHR = 9,8 e LEW = 9,9, controle e estressado, respectivamente.

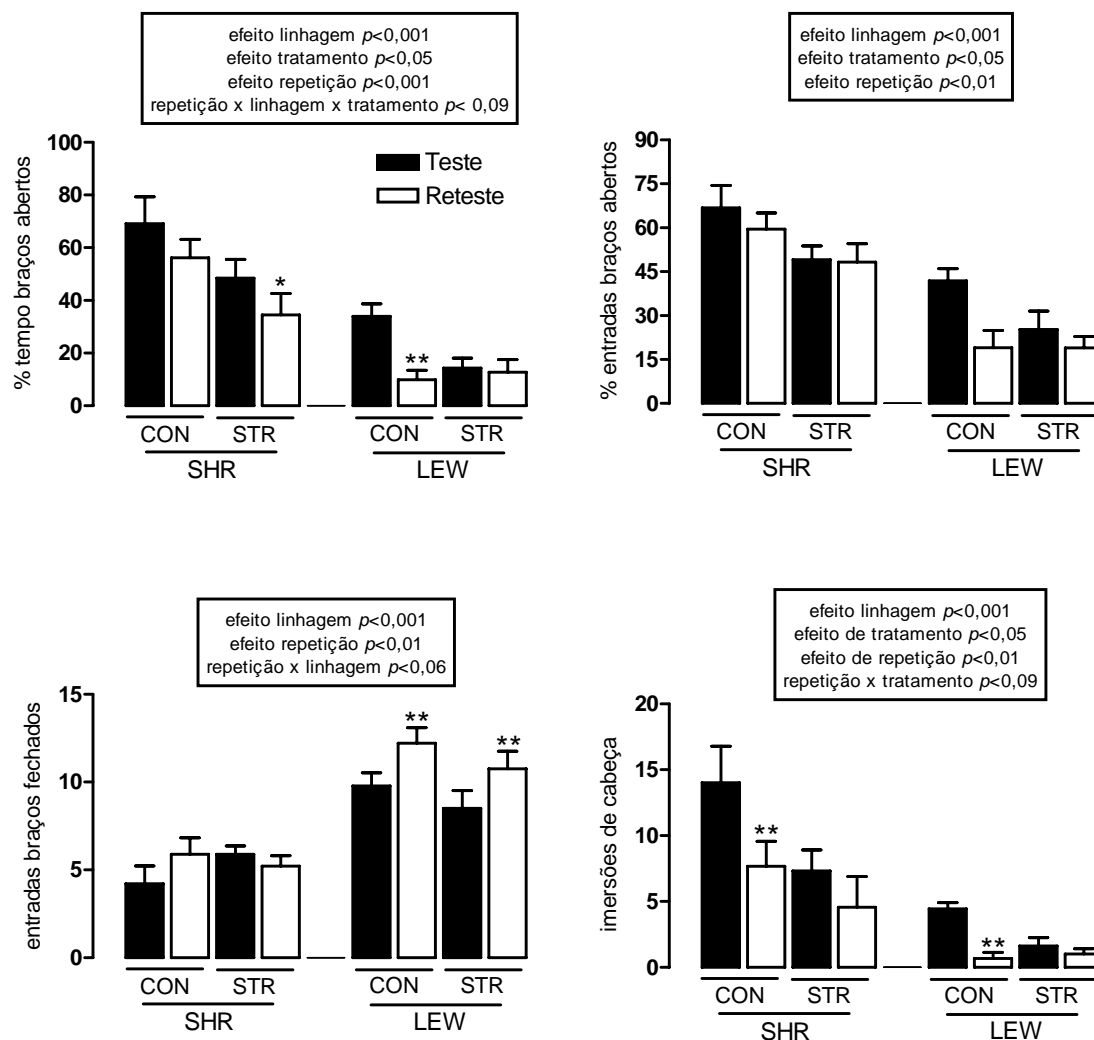


Figura 8 – Efeito da re-exposição ao LCE em ratas fêmeas submetidos ao protocolo de estresse IMOB-10d. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam os e.p.m. (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  em relação a primeira exposição; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* Newman Keuls). Número de animais utilizados: SHR = 9,9 e LEW = 9,8, controle e estressado, respectivamente.

#### 4.4.3 Estresse variado de 10 dias (VARI-10d)

Os dados obtidos estão representados nas figuras 9 (machos) e 10 (fêmeas). Com relação aos machos, na permanência nos braços abertos ocorreu um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=22,49$  e  $p<0,001$ ) e de repetição (Teste > Reteste;  $F=28,09$  e  $p<0,001$ ). No número de entradas nos braços abertos, houve um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=12,53$  e  $p<0,01$ ), tratamento (Controle > Estressado;  $F=5,37$  e  $p<0,05$ ) e repetição (Teste > Reteste;  $F=23,02$  e  $p<0,001$ ) além de uma interação entre linhagem e tratamento ( $F=4,29$  e  $p<0,05$ ). Com esta interação, um teste *post hoc* foi realizado e se verificou que apenas em SHR houve diferença entre controle e estressado (Controle > Estressado). No número de entradas nos braços fechados, foi verificado um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=15,22$  e  $p<0,001$ ). Também se observou uma interação entre repetição e linhagem ( $F=10,30$  e  $p<0,01$ ), onde no teste *post hoc* se verificou que apenas em animais SHR houve diferenças significativas em relação à repetição (Teste < Reteste). Com relação ao número de imersões de cabeça, um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=7,58$  e  $p<0,01$ ), tratamento (Controle > Estressado; Teste > Reteste;  $F=20,49$  e  $p<0,001$ ) e repetição (Teste > Reteste;  $F=45,92$  e  $p<0,001$ ) foi observado, além de uma interação entre repetição e tratamento ( $F=7,19$  e  $p<0,05$ ) apesar do teste *post hoc* indicar significância para todos os animais re-expostos ao LCE, em comparação à primeira exposição.

Já as fêmeas tiveram no parâmetro porcentagem de tempo nos braços abertos um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=20,85$  e  $p<0,001$ ) e repetição (Teste > Reteste;  $F=22,61$  e  $p<0,001$ ). No parâmetro de número de entradas nos braços abertos, foi verificado um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=18,95$  e  $p<0,001$ ) e repetição (Teste > Reteste;  $F=18,10$  e  $p<0,001$ ), além de uma interação entre repetição e linhagem ( $F=6,00$  e  $p<0,05$ ); interação esta, que demonstrou que ratos LEW re-expostos ao LCE tinham o número de entradas nos braços abertos diminuídos em relação ao grupo controle. Já o número de entradas nos braços

fechados teve um efeito geral de linhagem ( $SHR < LEW$ ;  $F=80,84$  e  $p<0,05$ ) e repetição (Teste  $<$  Reteste;  $F=6,67$  e  $p<0,05$ ). Por outro lado, no número de imersões de cabeça, um efeito geral de linhagem ( $SHR > LEW$ ;  $F=21,22$  e  $p<0,001$ ), tratamento (Controle  $>$  Estressado;  $F=6,29$  e  $p<0,05$ ) e repetição (Teste  $>$  Reteste;  $F=26,63$  e  $p<0,001$ ) foi observado. Além disso, foi observada uma interação entre linhagem e tratamento ( $F=4,79$  e  $p<0,05$ ), o que mostrou que há uma diferença entre animais SHR controle e estressado (Controle  $>$  Estressado).

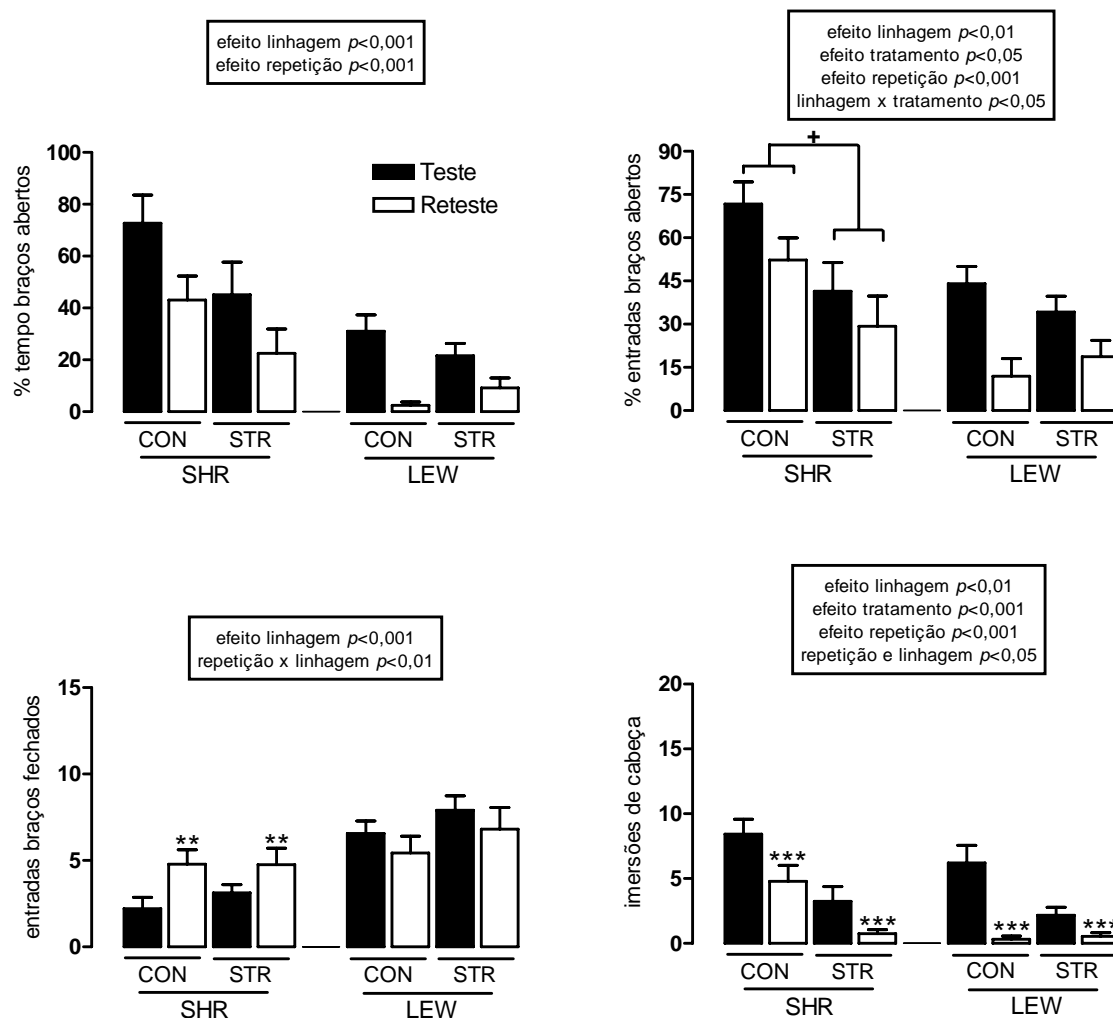


Figura 9 – Efeito da re-exposição ao LCE de ratos machos submetidos ao protocolo de estresse VARI-10d. Cada coluna representa a média da primeira exposição e as barras verticais indicam os e.p.m. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação a primeira exposição; + $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida teste *post hoc* Newman Keuls). Número de animais utilizados: SHR = 9,8 e LEW = 9,11, controle e estressado, respectivamente.

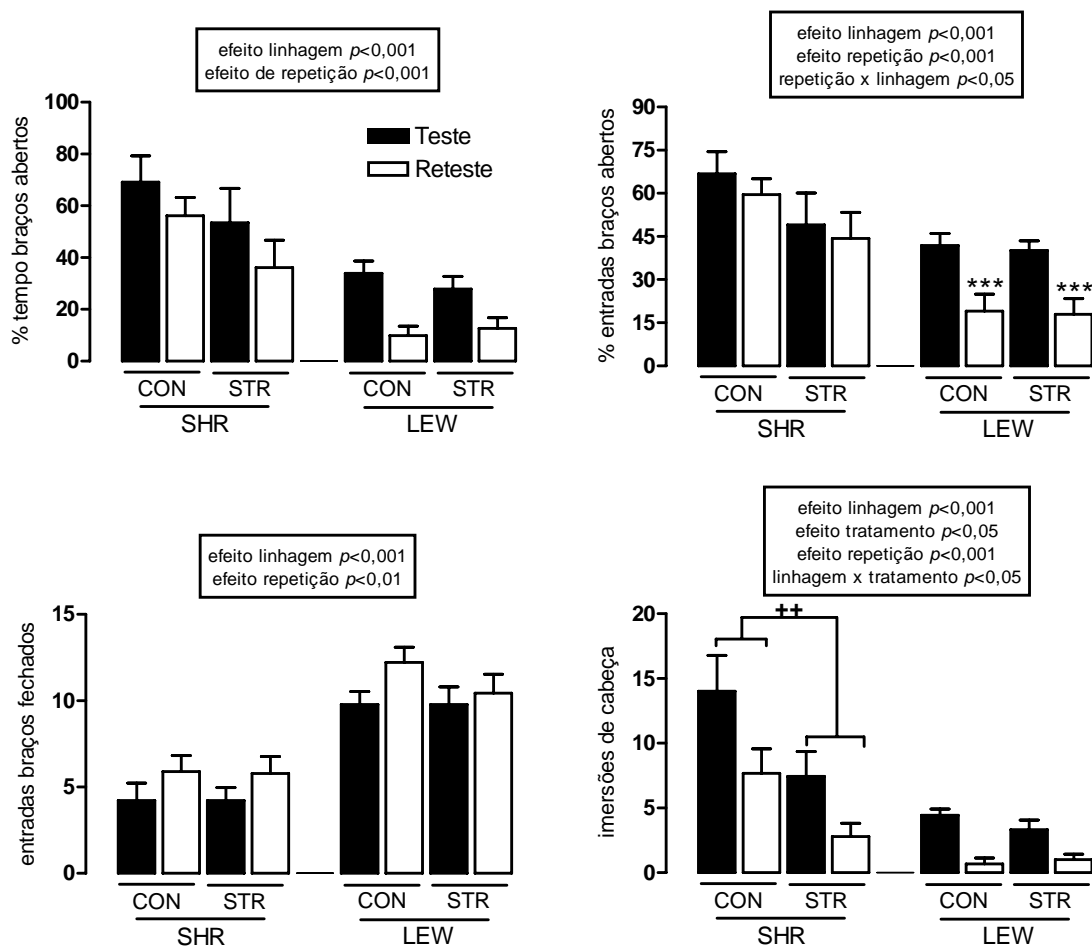


Figura 10 – Efeito da re-exposição ao LCE em fêmeas submetidas ao protocolo de estresse VARI-10d. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam os e.p.m. (\*\*\*) $p < 0,001$  em relação a primeira exposição; ++ $p < 0,01$  comparando controle e estressado; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* Newman Keuls). Número de animais utilizados: SHR = 9,9 e LEW 9,9, controle e estressado, respectivamente.

#### 4.4.4 Estresse variado e moderado por 28 dias (VARIm-28d)

Os dados referentes ao VARIm-28d estão representados nas figuras 11 (machos) e 12 (fêmeas). O VARIm-28d promoveu em machos, no parâmetro porcentagem de tempo nos braços abertos um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=36,00$  e  $p<0,001$ ) e um efeito geral de repetição (Teste > Reteste;  $F=36,01$  e  $p<0,001$ ). O mesmo ocorreu com a porcentagem de entradas nos braços abertos, isto é, um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=19,44$  e  $p<0,001$ ) e de repetição (Teste > Reteste;  $F=17,96$  e  $p<0,001$ ). Com relação ao parâmetro número de entradas nos braços fechados, observamos um efeito geral de repetição (Teste < Reteste;  $F=9,03$  e  $p<0,01$ ), uma interação entre repetição e linhagem ( $F=4,89$  e  $p<0,05$ ) e uma interação entre repetição, linhagem e tratamento ( $F=7,41$  e  $p<0,05$ ), que no teste *post hoc* mostrou um maior número de entradas nos braços fechados em SHR controle após serem re-expostos ao LCE. No parâmetro imersões de cabeça, um efeito de linhagem (SHR > LEW;  $F=20,33$  e  $p<0,001$ ) e de repetição (Teste > Reteste;  $F=41,39$  e  $p<0,001$ ) foi observado.

Em fêmeas, a permanência nos braços abertos teve um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=69,67$  e  $p<0,001$ ) e de repetição (Teste < Reteste;  $F=19,60$  e  $p<0,001$ ). O mesmo ocorreu em relação ao número de entradas nos braços abertos, onde um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=44,43$  e  $p<0,001$ ) e de repetição foi observado (Teste > Reteste;  $F=5,87$  e  $p<0,05$ ). O número de entradas nos braços fechados teve apenas um efeito geral de linhagem (SHR < LEW;  $F=44,47$  e  $p<0,001$ ). Já o número de imersões de cabeça teve um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=36,98$  e  $p<0,001$ ) e de repetição (Teste > Reteste;  $F=59,17$  e  $p<0,001$ ). Também foi observada uma interação entre repetição e tratamento ( $F=9,78$  e  $p<0,01$ ) que demonstrou que todos os animais re-expostos ao LCE imergiram a cabeça em menos vezes que na primeira exposição.



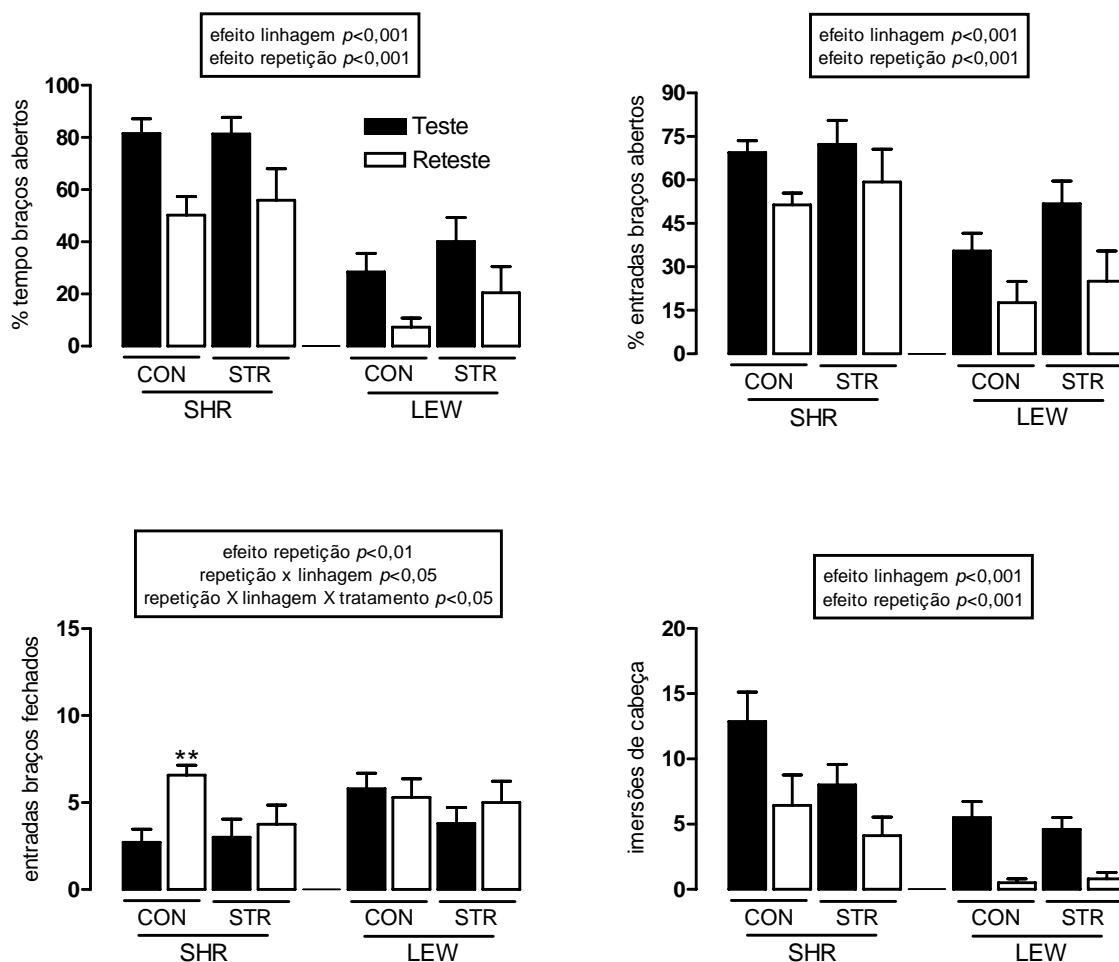


Figura 11 – Efeito da re-exposição ao LCE em ratos machos submetidos ao protocolo de estresse VARIm-28d. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam os e.p.m. (\*\* $p < 0,01$  em relação a primeira exposição; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post hoc* Newman Keuls). Número de animais utilizados: SHR = 7,8 e LEW = 10,10, controle e estressado, respectivamente.

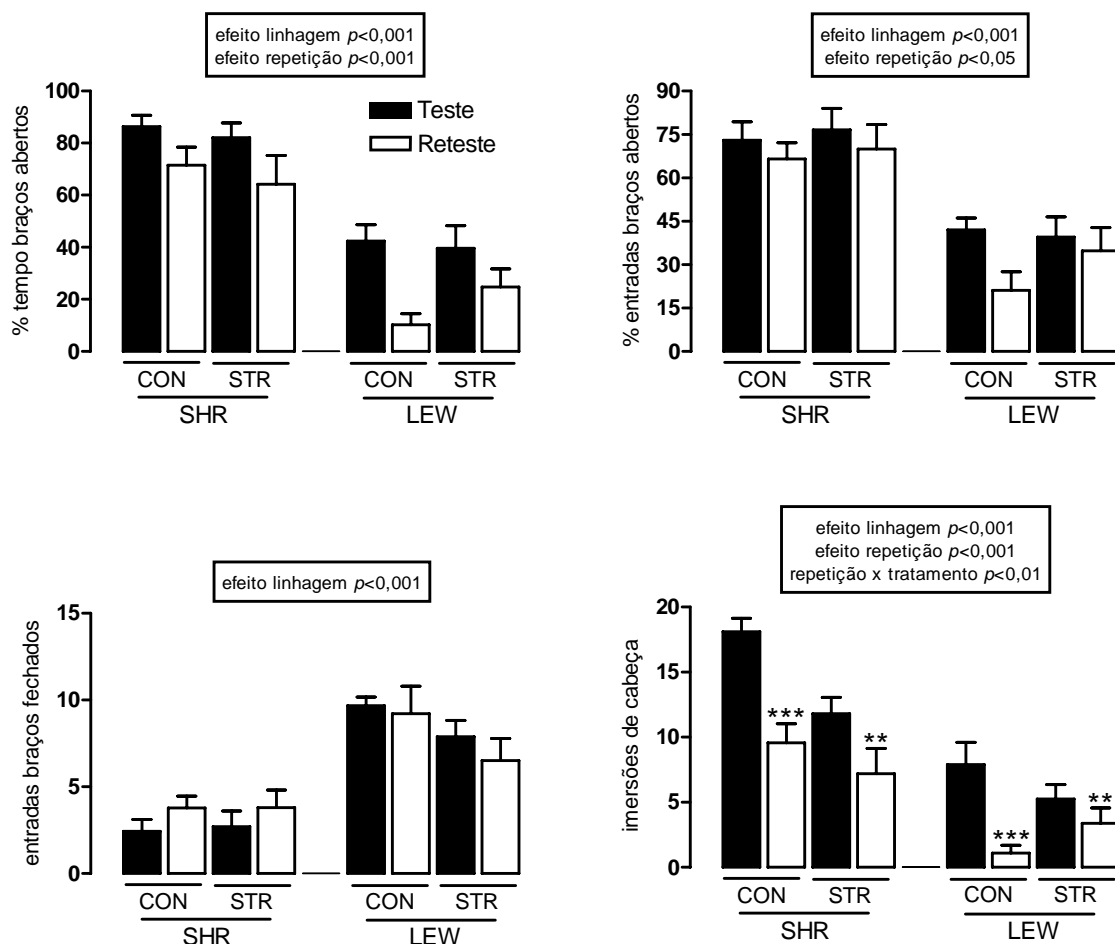


Figura 12 – Efeito da re-exposição ao LCE em fêmeas submetidos ao protocolo de estresse VARIm-28d. Cada coluna representa a média e as barras verticais indicam os e.p.m. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação a primeira exposição; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* Newman Keuls). Número de animais utilizados: SHR= 9,10 e LEW= 9, 8, para os grupos controle e estressado, respectivamente.

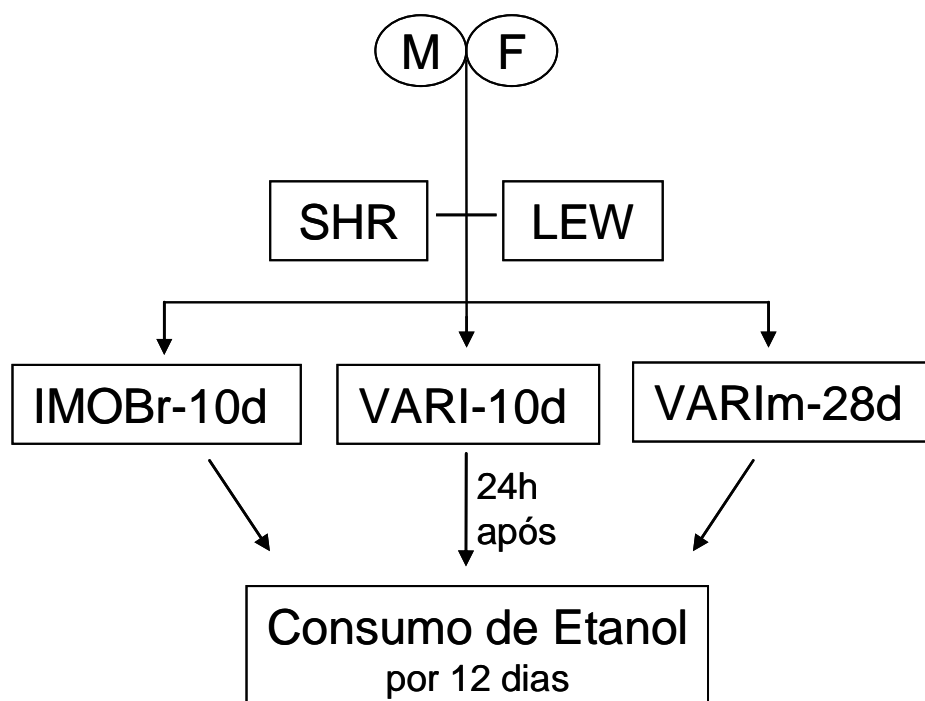
## 4.5 EFEITOS DE SITUAÇÕES DE ESTRESSE NO CONSUMO DE E/OU PREFERÊNCIA POR ETANOL

### 4.5.1 Objetivos específicos

- Verificar o efeito dos protocolos de estresse no consumo de/preferência por etanol nas linhagens de ratos SHR e LEW, machos e fêmeas.

### 4.5.2 Delineamento

Os animais foram submetidos aos protocolos de estresse (IMOB-10d, VARI-10d e VARIm-28d) e, 24 h após o último estressor, iniciaram o protocolo de consumo de/preferência por etanol durante 12 dias consecutivos.



## 4.6 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

### 4.6.1 Estresse de imobilização de 10 dias (IMOB-10d)

A figura 13 mostra os efeitos do estresse IMOB-10d no consumo e preferência de álcool em ratos SHR e LEW, em machos e fêmeas. Em machos, um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=11,12$  e  $p<0,01$ ) e um efeito de repetição foi observado ( $F=2,27$  e  $p<0,05$ ) no consumo por etanol 10%. Além disso, uma interação entre repetição e tratamento ( $F=2,58$  e  $p<0,05$ ) também foi observado. Ao observarmos a preferência por etanol, um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=10,69$  e  $p<0,01$ ) e de repetição ( $F=2,73$  e  $p<0,05$ ) também foi observado. No entanto não houve interação entre repetição e tratamento.

Em fêmeas observamos um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=11,02$  e  $p<0,01$ ) e uma interação entre repetição e tratamento ( $F=2,61$  e  $p<0,05$ ) no parâmetro consumo de etanol 10%. Já na preferência por etanol, observou-se apenas interações, entre repetição e linhagem ( $F=2,67$  e  $p<0,05$ ) e entre repetição e tratamento ( $F=2,54$  e  $p<0,05$ ).

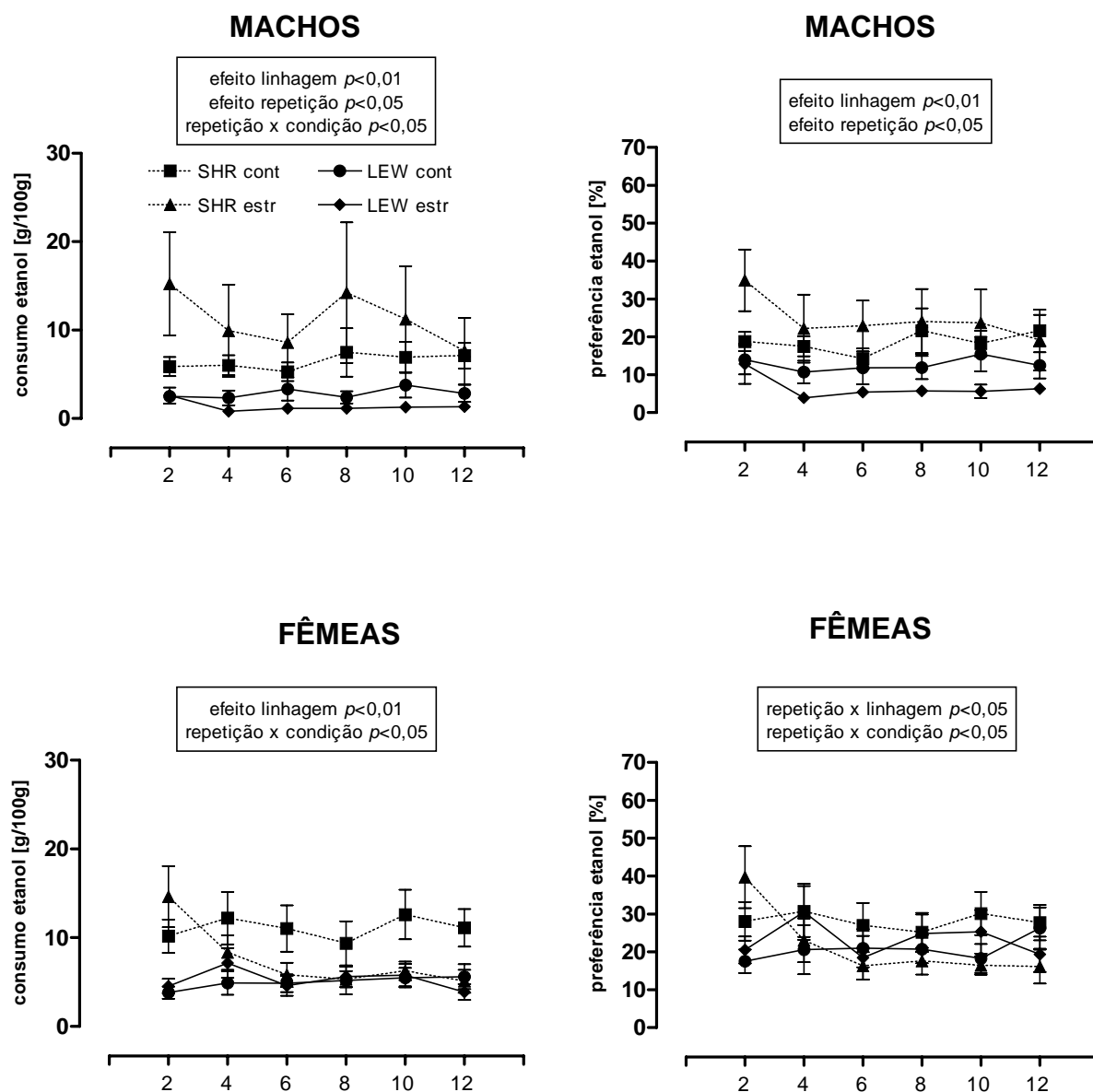


Figura 13 – Consumo (primeira coluna) e preferência (segunda coluna) de álcool a 10% (v/v) por 12 dias consecutivos após a submissão ao estresse IMOB-10d em ratos LEW e SHR machos (parte superior) e fêmeas (parte inferior). Livre escolha de álcool 10% vs. água. Os dados estão expressos como a quantidade de álcool em gramas por 100 gramas de peso corporal para cada dois dias. ANOVA de duas via com medidas repetidas foi efetuada. Número de animais por grupo: Machos SHR = 9,6; machos LEW = 11,8. Fêmea SHR = 9,7; Fêmeas LEW = 9,8, controle e estressado, respectivamente.

#### 4.6.2 Estresse variado de 10 dias (VARI-10d)

Os dados referentes aos animais submetidos ao VARI-10d estão na figura 14. Em machos, o consumo de etanol teve duas interações, sendo uma entre linhagem e tratamento ( $F=4,29$  e  $p<0,05$ ) em que o teste *post hoc* revelou uma tendência em SHR controle consumirem mais etanol do que o grupo estressado, e a outra, mostrando uma interação entre repetição e tratamento ( $F=3,63$  e  $p<0,01$ ), sem diferença estatística em teste *post hoc*. Os dados referentes à preferência indicaram um efeito geral de repetição ( $F=2,78$  e  $p<0,05$ ) e uma interação entre repetição e tratamento ( $F=3,21$  e  $p<0,01$ ) nos animais submetidos ao VARI-10d.

Em fêmeas, o consumo promoveu um efeito geral de linhagem (SHR > LEW;  $F=13,36$  e  $p<0,001$ ) e um efeito geral de tratamento (Controle > Estressado;  $F=9,94$  e  $p<0,01$ ). Além disso, uma tendência na interação linhagem e tratamento ( $F=3,23$  e  $p<0,09$ ) demonstraram em teste *post hoc* que a diferença entre tratamento estava localizada especificamente na linhagem SHR (Controle > Estressado). Com relação a porcentagem de etanol consumida pelos animais, houve um efeito geral de tratamento (Controle > Estressado;  $F=7,96$  e  $p<0,01$ ) e uma interação entre repetição e tratamento ( $F=3,27$  e  $p<0,01$ ).

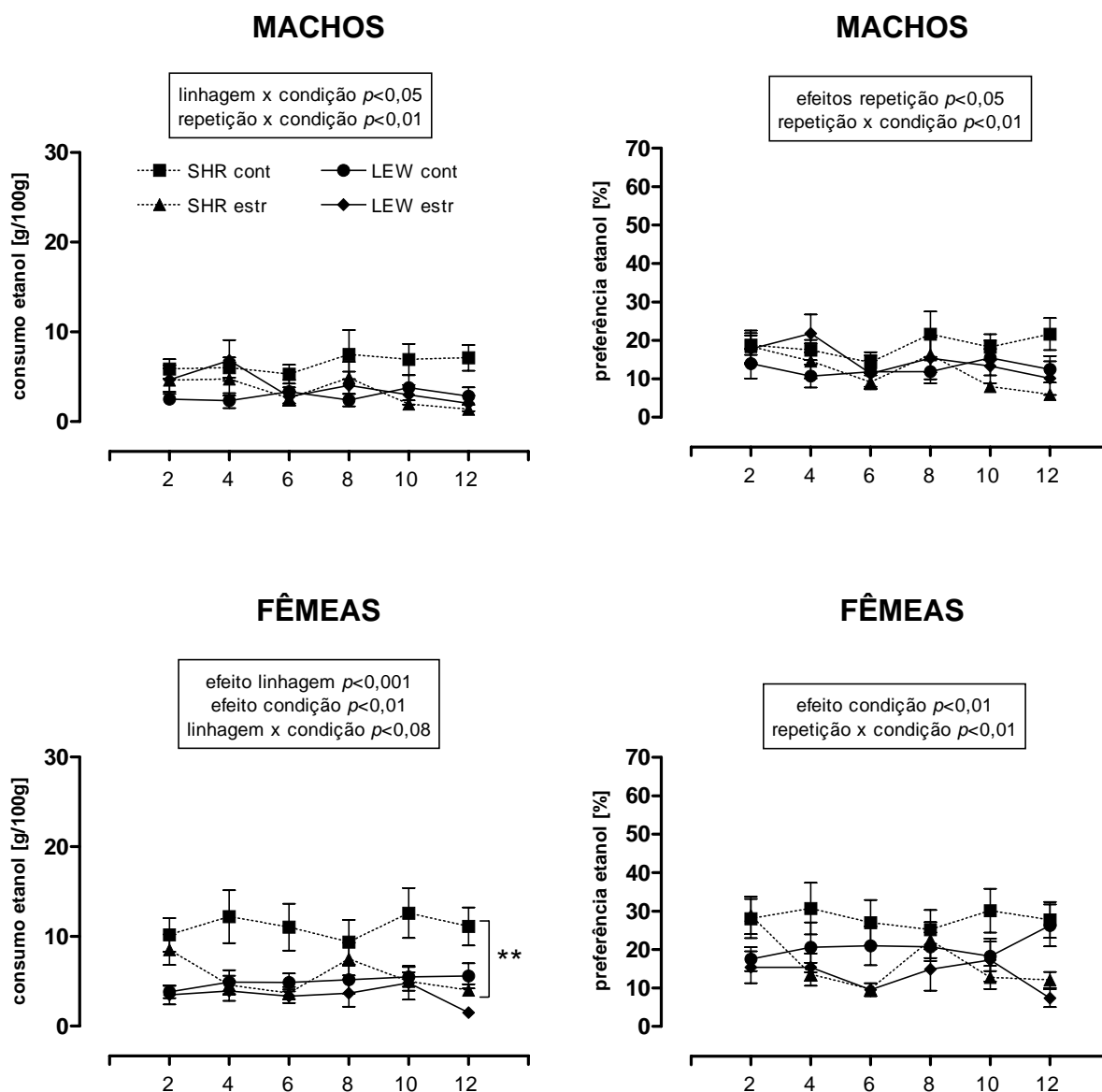


Figura 14 – Consumo (primeira coluna) e preferência (segunda coluna) de álcool a 10% (v/v) por 12 dias consecutivos após a submissão ao estresse VARI-10d em ratos SHR e LEW machos (parte superior) e fêmeas (parte inferior). Livre escolha de álcool 10% vs. água. Os dados estão expressos como a quantidade de álcool em gramas por 100 gramas de peso corporal para cada dois dias.  $**p < 0,01$  entre SHR controle e estressado; ANOVA de duas via com medidas repetidas seguida de teste *post hoc* Newman Keuls. Número de animais por grupo: Machos SHR = 9,8; machos LEW = 11,9. Fêmeas SHR = 9,8; Fêmeas LEW 9,10, controle e estressado, respectivamente.

#### 4.6.3 Estresse variado e moderado (VARIm-28d)

A figura 15 mostra o efeito do estresse variado e moderado de 28 dias (VARIm-28d) no consumo e preferência por etanol 10%. Observou-se na linhagem SHR um aumento de consumo em ambos os sexos ( $F_{(1,31)}=8,67$ ,  $p<0,05$  e  $F_{(1,31)}=8,862,37$ ,  $p<0,01$ , macho e fêmea, respectivamente), enquanto que a preferência por etanol aumentou apenas em ratos machos ( $F_{(1,31)}=10,70$ ,  $p<0,01$ ). Um efeito de repetição também foi observado em machos ( $F_{(1,31)}=2,41$ ,  $p<0,05$  e  $F_{(1,31)}=3,15$ ,  $p<0,05$ , para consumo e preferência, respectivamente). Não se observou diferenças estatísticas na linhagem LEW (figura 19) para o consumo e a preferência ao etanol após a submissão ao VARIm-28d.



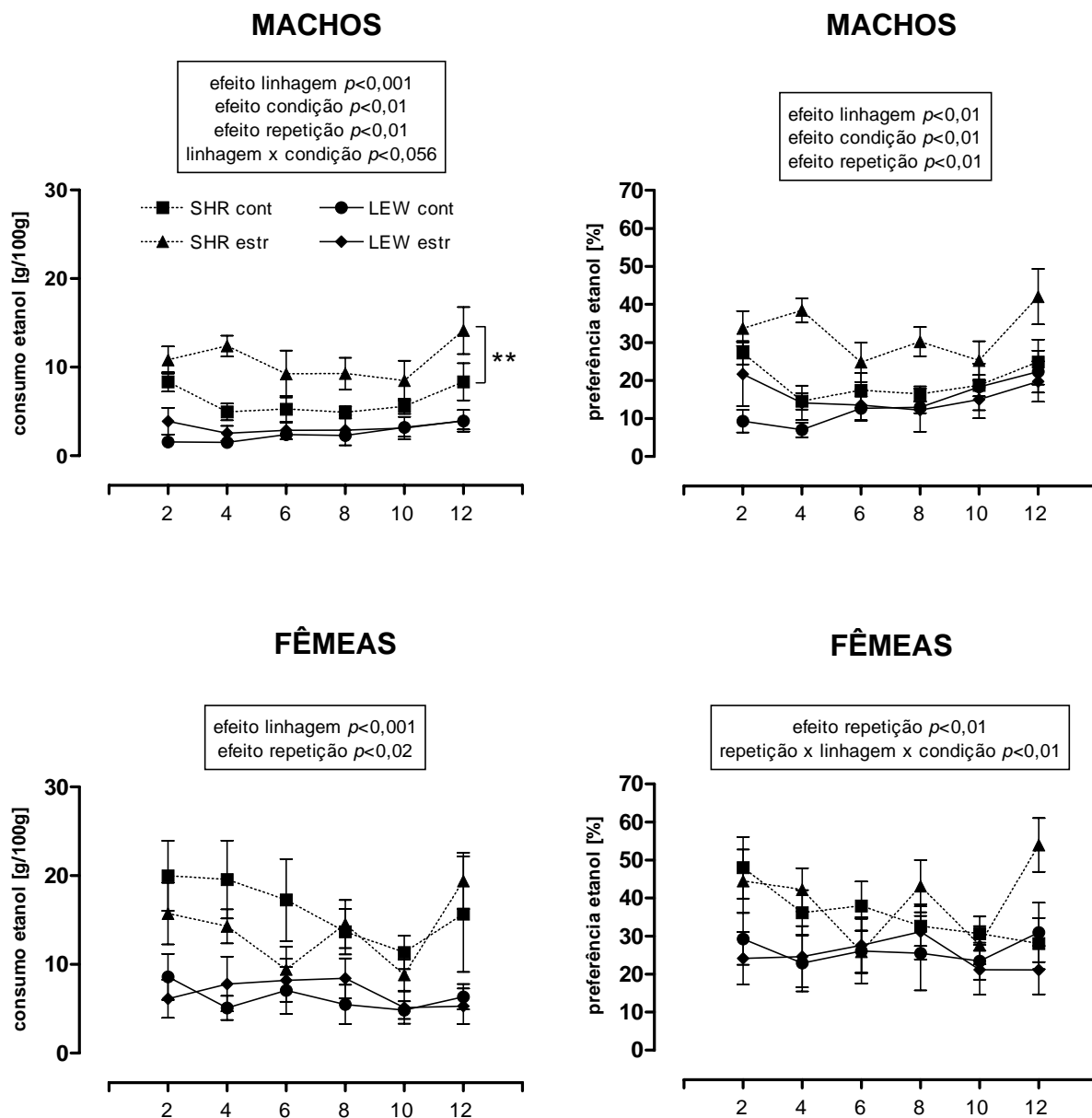


Figura 15 – Consumo (primeira coluna) e preferência (segunda coluna) de álcool a 10% (v/v) por 12 dias consecutivos após a submissão ao estresse VARIm-28d em ratos LEW e SHR machos (parte superior) e fêmeas (parte inferior). Livre escolha de álcool 10% vs. água. Os dados estão expressos como a quantidade de álcool em gramas por 100 gramas de peso corporal para cada dois dias. \*\* $p < 0,01$  comparando SHR controle e estressado; ANOVA de duas via com medidas repetidas seguida do teste *post hoc* Newman Keuls. Número de animais por grupo: Macho SHR = 8,9; Machos LEW = 8,9. Fêmeas SHR = 9,9; Fêmeas LEW = 11,11, controle e estressado, respectivamente.

## **5. DISCUSSÃO**

Nosso trabalho objetivou verificar a influência de estressores com características distintas no perfil comportamental relacionado ao medo e à ansiedade em duas linhagens contrastantes para esta psicopatologia, além da influência de tais estressores no consumo de álcool destas linhagens, que em condições normais, também diferem em relação a este comportamento.

As linhagens LEW e SHR utilizadas em nosso laboratório, sob nossas condições de experimento, apresentaram o mesmo perfil contrastante para ansiedade (LEW “ansioso”, SHR “não ansioso”) amplamente observado e descrito na literatura (Ramos et al., 1997; 1998; Berton et al., 1998, Takahashi et al., 2001; Ramos et al., 2002; Vendruscolo et al., 2003). Além disso, nossos experimentos mostraram que a linhagem LEW entra mais nos braços fechados (importante medida de locomoção) do labirinto do que o SHR e, embora não seja unanimidade na literatura (Takahashi et al., 2001; Izídio et al., 2005), é frequentemente encontrada em investigações da área (Ramos et al., 1997; Berton et al., 1998).

Sabe-se que a ansiedade, junto com a depressão, são psicopatologias de grande prevalência no mundo moderno (Kessler et al., 1994) e, apesar do sucesso das terapias medicamentosas atuais, estes medicamentos ainda têm seu uso limitado principalmente pelos seus efeitos colaterais (Rupniak et al., 2000). Ao mesmo tempo, novos candidatos a ansiolíticos têm sido testados em diversos laboratórios e, apesar do sucesso razoável nas abordagens experimentais usadas até o momento, há várias inconsistências entre os dados pré-clínicos e clínicos. Podemos afirmar que a principal discrepância entre os modelos animais e os distúrbios humanos diz respeito ao estado fisiológico/psicológico dos indivíduos, ou seja, enquanto os animais de experimentação são geralmente animais normais não estressados, os pacientes, em geral, têm uma longa história de experiências estressantes (Haller, 2001). E,

consequentemente, a prática de testar prováveis ansiolíticos em animais não estressados pode levar as conclusões inadequadas em alguns casos.

Vários trabalhos têm demonstrado que diferentes protocolos de estresse provocam adaptações comportamentais, neurobiológicas e endócrinas distintas em animais de laboratório (Haile et al., 2001; Vyas et al., 2002; Vyas & Chattarji, 2004) e que diferentes linhagens de roedores também apresentam comportamentos diferenciados após um mesmo protocolo estressor (Armário et al., 1995; Bekris et al., 2005; Baker et al., 2006), embora outros trabalhos não tenham encontrado diferenças interlinhagem (Berton et al., 1998; Vendrusculo et al., 2006). Além disso, diferenças comportamentais e endócrinas também são freqüentemente observadas entre machos e fêmeas (Dalla et al., 2005; Mitra et al., 2005). Corroborando com as evidências experimentais citadas, nosso trabalho também demonstrou, de uma maneira geral, reações distintas entre estressores diferentes, bem como algumas diferenças comportamentais entre as linhagens, e entre sexos, aqui estudadas.

Com base em nossos resultados, podemos afirmar que, entre todos os protocolos de estresse utilizados, o estresse IMOB-10d promoveu as maiores alterações comportamentais nos animais avaliados no LCE, caracterizando um perfil ansiogênico claro, sem distinção de linhagem, corroborando com dados da literatura (Vyas et al., 2002; Vyas & Chattarji, 2004) e, embora evidenciado em menor intensidade, o estresse VARI-10d, também produziu comportamento do tipo ansioso. Entretanto, a linhagem SHR mostrou-se mais sensível a este protocolo do que a linhagem LEW.

As fêmeas são frequentemente apontadas como mais sensíveis a transtornos psiquiátricos como a ansiedade e a depressão. No entanto, há poucos estudos disponíveis com fêmeas na literatura e os existentes são contraditórios, na dependência do tipo de estressor utilizado no experimento (Dalla et al., 2005; Mitra et al., 2005). Na verdade, as fêmeas realmente exibem níveis mais elevados de glicocorticóides após o estresse e, de certa forma,

as diferenças quanto à resposta ao estresse dependem da presença dos hormônios ovarianos, indicando uma possível alteração de hormônios sexuais endógenos pelo estresse (Wood & Shors, 1998). Além disso, o estradiol e seus precursores podem ser liberados tanto pelas glândulas adrenais quanto pelos ovários, promovendo uma atividade adrenal maior em resposta à exposição à estressores (McNiven, 1992). Em adição, o estrógeno estimula a neurogênese no giro dentado (Tanapat et al., 1999) e as fêmeas parecem ser mais resistentes à indução de atrofia hipocampal após estresse do que em machos (Galea et al., 1997). Em adição, Mitra e colaboradores (2005) utilizando protocolos de estresse similares ao nosso (IMOB-10d e VARI-10d), não observaram diferenças comportamentais em Wistar fêmeas, em contraste com nossos dados com linhagens isogênicas.

Mesmo que o protocolo VARI-10d não tenha provocado alterações comportamentais em Wistar (Vyas et al., 2002; 2004; Matuszewich et al., 2007), o fato de que a linhagem SHR tenha certa sensibilidade aos efeitos do estresse (Armario et al., 1995) pode ter contribuído para os nossos resultados. No entanto, o protocolo de Armario e colaboradores (1995) consistia de um estresse agudo e não um protocolo mais extenso como o utilizado em nosso laboratório. Além disso, protocolos de estresse mais prolongados e que promoveriam neuromodulações similares ao nosso protocolo, como o de Berton e colaboradores (1998), evidenciaram diferenças entre as linhagens opostas ao nosso, com ratos LEW sendo mais sensíveis ao protocolo de estresse do que ratos SHR.

De fato, todos os animais testados esquivaram-se dos compartimentos aversivos do LCE após serem submetidos ao estresse IMOB-10d, um tipo de estresse previsível. Isso se explicaria pelo crescente número de evidências apontando o estresse previsível como o indutor de hipertrofia dendrítica em neurônios na porção basolateral da amígdala (estrutura chave envolvida na memória emocional), enquanto o outro estresse, o VARI-10d, falhou em promover adaptações nesta região da amígdala (Vyas et al., 2002), sugerindo que tais

adaptações também poderiam estar ocorrendo em LEW e principalmente SHR. Embora haja relatos de que protocolos com estresse repetido promovem habituação nos animais (Melia et al., 1994), nosso protocolo e outros descritos na literatura (Vyas et al., 2002; Vyas & Chattarji, 2004) não têm observado tal habituação comportamental. Em adição, Vyas e colaboradores (2002) também evidenciaram uma hipertrofia adrenal nos animais submetidos ao estresse IMOB-10d, quando comparados a animais controle, sugerindo uma hiperativação do eixo HPA e possíveis danos aos neurônios hipocâmpais. Embora não analisados em nosso estudo, podemos sugerir, baseado em nossos dados comportamentais, que as linhagens SHR e LEW também apresentaram alterações endócrinas e neuroanatômicas quando foram submetidos ao estresse IMOB-10d.

Por sua vez, o estresse considerado agudo (IMOB-1d), que muitas vezes é utilizado como um potencializador do medo não promoveu alterações comportamentais nos ratos SHR e LEW de ambos os sexos. Dados da literatura mostram certa controvérsia quando os animais são expostos uma única vez a um estressor, havendo diferenças entre os estressores utilizados e o tempo após o estressor em que o animal é observado no LCE para produzir um estado de medo no roedor (Mechiel Korte & De Boer, 2003; Gameiro et al., 2006). Mitra e colaboradores (2005b), em um estudo similar ao nosso, só que utilizando ratos da linhagem Wistar, observaram uma redução da permanência nos braços abertos em relação aos seus controles 24 h após a aplicação do estressor. Com relação às linhagens testadas neste estudo, o período de 24h para a exposição ao LCE após o estresse parece ter sido um intervalo longo demais para que houvesse alguma alteração comportamental. Entretanto, esta hipótese não corrobora dados de Padovan & Guimarães (2000) que ao analisarem o comportamento de ratos Wistar no LCE em diferentes intervalos de tempo após o estresse agudo, demonstraram que era necessário no mínimo 24 h de intervalo para que houvesse aumento da ansiedade nos animais em estudo. Com isso, sugerimos que nossos resultados talvez sejam devidos a uma

maior resistência das linhagens utilizadas (SHR e LEW) em apresentar alterações comportamentais no LCE em resposta a esse estresse.

O estresse VARIm-10d também não promoveu alterações comportamentais em ambas as linhagens e sexos, exceto por um efeito ansiogênico em animais SHR observados no parâmetro imersões de cabeça. Nosso protocolo de estresse VARIm-10d é um protocolo crônico, baseado em protocolos utilizados em um modelo chamado *chronic mild stress*, é bastante utilizado para induzir estado anedônico no rato, o que seria similar à depressão (Willner, 1987). No entanto, raramente trabalhos que tentam induzir anedonia investigam o nível de ansiedade destes animais e, quando testado, nenhuma alteração comportamental foi observada (Vasconcellos, 2005). Por outro lado, dependendo da duração dos estressores, os níveis dos marcadores de estresse estão normalizados, indicando uma adaptação do organismo do animal ao estresse (Willner, 2005). Corroborando com esta idéia, uma adaptação dos animais aos estressores pode ter ocorrido, já que os estressores utilizados repetiam-se todas as semanas.

Em relação às conseqüências da pré-exposição ao LCE nas respostas comportamentais obtidas durante a re-exposição, um grande número de estudos tem demonstrado que ela provoca um aumento na esquia dos braços abertos (redução significativa da %TAB e/ou da %AB) e compromete o efeito ansiolítico de drogas, caracterizado pela ausência de um aumento significativo na exploração dos braços abertos. Esta alteração de comportamento estaria associada a uma mudança qualitativa do estado emocional do roedor de uma ansiedade inata ou incondicionada (primeira exposição ao LCE) para uma resposta de medo condicionada na segunda exposição (Treit et al., 1993; File et al., 1998). Com isso, sugere-se que a consolidação da ansiedade durante a segunda exposição representaria um estado de ansiedade condicionado pela experiência aversiva da primeira exposição. Além do mais,

exposições prévias a eventos estressantes podem potencializar o comportamento de medo e de ansiedade em ratos (Adamec et al., 1999).

Com base nisso, nosso experimento objetivou analisar o comportamento de linhagens contrastantes para ansiedade, inclusive quando re-expostos ao LCE. Em nosso experimento, ao analisarmos os animais utilizados como controle, verificamos que o contraste inter-linhagem também persiste na re-exposição, mas o efeito do segundo teste em relação ao primeiro, aparece de maneira distinta para cada linhagem, especialmente em fêmeas. Enquanto que machos, tanto a linhagem SHR quanto a LEW, apresentaram uma grande aversividade na re-exposição ao LCE, as fêmeas SHR frequentemente mostraram-se insensíveis em apresentar um efeito ansiogênico na re-exposição ao LCE. Já LEW esquivaram-se dos braços abertos do LCE na re-exposição de modo parecido ao dos machos desta linhagem. Os dados acima, estão de acordo com o estudo de Izídio e colaboradores (2005) mostrando esquiva dos compartimentos abertos na re-exposição, entretanto, estes autores relataram que esta diferença ocorria em todas as linhagens e sexos, contrariando nossos dados com fêmeas. Além disso, novamente em contraste com os dados de Izídio e colaboradores (2005), em nosso experimento apenas os machos da linhagem SHR mostraram aumento de entradas nos braços fechados na re-exposição ao LCE e não todos os animais como descrito por estes autores. Tais diferenças poderiam ser justificadas pelo uso de LCE diferente (utilizamos LCE com braços fechados transparentes, eles utilizaram LCE com braços fechados pretos), além da diferença de luminosidade na sala de experimentação (70 lux por Izídio e colaboradores e 1 lux pelo estudo) (Godinho et al., 2007).

Estas linhagens também foram submetidas a eventos estressantes antes da primeira exposição ao LCE, para avaliar o efeito de situações aversivas na re-exposição ao aparato. Nossos resultados mostraram que os roedores machos submetidos ao estresse agudo (IMOB-1d), apresentaram de uma maneira geral um perfil ansiogênico na re-exposição ao modelo,

comportamento similar ao observado nos grupos controle. Além disso, ratos SHR re-expostos ao LCE apresentaram aumento do número de entradas nos braços fechados, dado também compatível com o apresentado nos seus respectivos controles. Este aumento do número de entradas nos braços fechados da linhagem de ratos SHR corrobora dados da literatura, sugerindo menor aversão com o aparato após a primeira exposição (Osenkopp et al., 1994; Izídio et al., 2005). Já os ratos LEW mantiveram-se iguais à primeira exposição, contrariando dados da literatura acima citada. Por outro lado, as fêmeas SHR não tiveram alteração comportamental no sentido ansiogênico, quando foram re-expostas ao LCE e comparadas à primeira exposição. Além disso, o aumento de entradas nos braços fechados, evidenciado em SHR machos, não ocorreu nas fêmeas. Enquanto isso, fêmeas da linhagem LEW apresentaram um perfil ansiogênico (já observado em machos) na re-exposição ao LCE, confirmando a consolidação do medo obtido com a primeira exposição, e da mesma forma encontrada em machos LEW, o aumento de entradas nos braços fechados não foi evidenciado. Com base nos dados acima, podemos sugerir que o estresse agudo aqui usado (IMOB-1d) em nada altera o comportamento das linhagens estudadas, quando estas são novamente expostas ao LCE, da mesma maneira que este protocolo também não influencia no comportamento do ratos quando expostos pela primeira vez ao aparato.

No protocolo de estresse IMOB-10d, nossos dados revelaram que os ratos SHR e LEW machos tiveram seu comportamento inalterado em relação a primeira exposição em todos os parâmetros relacionados a ansiedade. Tais resultados estão de acordo com dados da literatura observados com a linhagem Wistar (Vyas & Chattarji, 2004), onde uma re-exposição ao LCE não alterou os níveis de ansiedade destes animais, sugerindo uma falha na consolidação da ansiedade após a primeira exposição ao LCE nestas linhagens. Uma hipótese para essa situação é a alta aversividade do protocolo IMOB-10d, que acaba promovendo um estado ansiogênico elevado já na primeira exposição, que não consegue ser ampliado na re-exposição



(Bertoglio & Carobrez, 2000; Vyas et al., 2002; Vyas & Chattarji, 2004; Mitra et al., 2005). Embora com médias muito próximas (o que caracterizaria sem diferenças entre teste e re-teste), em fêmeas houve de maneira geral diferenças entre a primeira e a segunda exposição, principalmente em animais SHR. Por outro lado, em fêmeas LEW, as semelhanças entre teste e re-teste foram mais fortes, não caracterizando de maneira geral qualquer diferença entre os testes, acompanhando o que ocorreu com os machos desta linhagem. No entanto, nossos dados com a fêmeas, devido à dificuldade da análise não são conclusivos, sendo talvez necessário outro tipo de análise ou um maior número de animais. Já a literatura, utilizando ratos Wistar fêmeas, mostrou que há consolidação da ansiedade adquirida na primeira exposição na re-exposição ao LCE em animais submetidos a ambos os estressores de 10 dias (Mitra et al., 2005), em contraste com nossos dados, principalmente em relação ao Lewis, pois neste trabalho os animais utilizados não sofreram qualquer efeito em relação ao estresse IMOB-10d na primeira exposição, sendo então possível um efeito ansiogênico quando re-expostos ao LCE. Desta forma, os dados de nosso laboratório corroborariam com a literatura já que a linhagem SHR não sofreu efeito pelo estresse aplicado quando submetido pela primeira exposição ao LCE, mas quando foi re-exposto, tornou-se sensível (efeito ansiogênico em relação à primeira exposição). Por outro lado, as fêmeas LEW tiveram um efeito ansiogênico pronunciado quando submetidos à IMOB-10d, o que inviabilizaria o efeito ansiogênico da re-exposição ao aparato.

Quando os machos das linhagens LEW e SHR machos foram submetidos em outro protocolo com dez dias de duração, denominado VARI-10d, observou-se comportamento diferente do observado no IMOB-10d, com os ratos apresentando um perfil ansiogênico no re-teste. Nossos dados estão de acordo com a literatura, em que ratos Wistar, num protocolo de estresse similar ao realizado neste trabalho, na segunda exposição ao LCE, apresentaram perfil ansiogênico evidente, provavelmente porque este protocolo de estresse não é aversivo aos

animais (presença de efeito ansiogênico na primeira exposição), o que permitiria o aparecimento de um perfil ansiogênico pronunciado no re-teste (Vyas & Chattarji, 2004), da mesma forma do que foi encontrado em nosso experimento utilizando linhagens isogênicas. As fêmeas SHR utilizadas no experimento apresentaram perfil ansiogênico menos pronunciado na re-exposição do que a linhagem LEW, que, por sua vez, teve uma grande aversividade dos compartimentos abertos do LCE quando re-expostos. Nossos dados com fêmeas das linhagens SHR e LEW corroboram novamente dados da literatura que mostram que fêmeas Wistar neste tipo de estresse (VARI-10d) mostram perfil ansiogênico na re-exposição ao LCE, porque este tipo de estresse não é capaz de promover alterações comportamentais na primeira exposição (Mitra et al., 2005). De fato, os dados referentes à primeira exposição ao LCE mostram que fêmeas SHR sofreram mais os efeitos do estresse do que as LEW.

Os dados obtidos após o estresse crônico de 28 dias (VARIm-28d) mostram que ratos SHR e LEW machos tiveram aumento da ansiedade após a primeira exposição sem qualquer alteração da atividade locomotora. Em fêmeas, embora menos evidente, principalmente nas SHR cujo padrão comportamental da re-exposição foi muito próximo da exposição, também ocorreu aumento da ansiedade quando re-expostas ao LCE, não sendo também observada alteração locomotora entre as exposições. Nossos dados sugerem novamente a necessidade do fator aversivo do protocolo de estresse para a primeira exposição, ocasionando assim o não aumento da ansiedade na segunda exposição (Bertoglio & Carobrez, 2000; Vyas & Chattarji, 2004).

Em relação à influência das situações de estresse no consumo de/preferência por etanol, a relação entre estresse e uso de drogas tem sido amplamente discutida, tanto na mídia leiga como na literatura científica. Vários estudos encontram associação entre uso abusivo de álcool e a ocorrência de tipos específicos de estresse (Pohorecky, 1990; Tanaka, 1998; Brunell

& Spear, 2005; Lach et al., 2006), mas a natureza desta relação ainda precisa ser elucidada. Além disso, um importante aspecto envolvido no aumento da vulnerabilidade à auto-administração de drogas de abuso está relacionado à atividade do eixo HPA e a psicopatologias, como a ansiedade e a depressão (Sinha, 2001), que dependem de uma variabilidade individual (Koolhaas et al., 1999). Sabemos que um dos locais de atuação dos glicocorticóides, parece ser a via dopaminérgica mesolímbica (Piazza et al., 1996; Piazza et al., 1998), pois após situações de estresse, pode haver ativação de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, levando ao aumento da liberação de dopamina no núcleo *accumbens*, o que retorna ao seu estado normal quando o estresse não se prolonga.

Nossos resultados são controversos neste aspecto, mas apóiam dados descritos na literatura quanto ao fato do estresse produzir alteração no consumo de álcool. Vários trabalhos vêm demonstrando que a exposição aos mais variados protocolos de estresse promovem aumento da auto-administração de drogas de abuso, inclusive o álcool (Piazza et al., 1990; Volpicelli & Ulm, 1990; Kosten et al., 2000; Lach et al., 2006), enquanto outros estudos demonstram diminuição no consumo (van Erp & Miczek, 2001). Em um trabalho utilizando estressores de 10 dias similares ao usado no presente estudo, Haile e colaboradores (2001) verificaram que o estresse imprevisível, mas não o estresse previsível, provocava aumento da sensibilidade aos efeitos da cocaína em ratos não isogênicos Sprague-Dawley. Em outro trabalho, utilizando camundongos imobilizados por 7 dias, Trindade (2006) demonstrou não haver alteração da resposta aguda ao etanol, enquanto Roberts e colaboradores (1995) evidenciaram em camundongos estressados por imobilização (2h/10 dias) efeitos estimulantes pelo etanol maiores do que os animais observados com os não estressados.

Além disso, dados com as mesmas linhagens em estudo no presente trabalho, em condições sem estresse, apresentaram discrepância. Enquanto alguns autores apresentam a linhagem menos ‘ansiosa’ (SHR), como maior consumidora de etanol em relação à mais

‘ansiosa’ (LEW), considerada modelo animal para drogas de abuso (Da Silva et al. 2004; Vendrusculo et al., 2005), outros mostram a linhagem LEW como a que mais consome etanol (Izídio, 2005). Os resultados obtidos em nosso laboratório corroboram com os dados de Da Silva e colaboradores (2004) e Vendrusculo e colaboradores (2005), tendo a linhagem SHR, de uma maneira geral como a que mais consumiu e preferiu a solução alcoólica em relação a linhagem LEW, independentemente do sexo estudado.

Nossos dados referentes ao estresse IMOB-10d indicam que este protocolo não foi suficiente para promover o aumento de consumo de etanol em ambas as linhagens. Como já sabemos, o aumento do consumo de drogas de abuso como o álcool pode está correlacionado com a ativação do eixo HPA (Deroche et al., 1992; Przegalinski et al., 2000). No entanto, é pouco provável que este protocolo não tenha provocado à ativação do eixo HPA já que é um protocolo considerado bastante severo, pois é frequentemente observado na literatura alterações nos níveis dos hormônios de estresse, tamanho das glândulas produtoras de tais hormônios e ulcerações estomacais em protocolos de estresse similar ao nosso (Rockman et al., 1986; Vyas et al., 2002). Por outro lado, os dados relativos a este protocolo contrariam a hipótese de que indivíduos ansiosos consumiriam mais etanol para aliviar o estado emocional presente (Wand, 2005), haja vista que este mesmo protocolo foi o que mais aumentou o nível de ansiedade dos animais experimentados, mas não o consumo de álcool. Outro problema encontrado, devido ao uso da via oral do álcool, refere-se ao sabor da solução alcoólica, que muitas vezes pode ser aversiva ao animal, e isto, aliado aos estímulos aversivos recebidos, poderia justificar a diminuição do consumo, principalmente em fêmeas SHR, que após o estímulo inicial pela novidade de uma nova garrafa na gaiola, passaria a evitar este bebedouro devido ao seu sabor aversivo.

Da mesma forma, o protocolo VARI-10d não revelou diferenças entre o grupo controle e aquele submetido ao estresse em machos de ambas as linhagens experimentais, mas uma

interação entre tratamento e repetição mostrou que o grupo SHR submetido ao estresse teve o consumo e a preferência por álcool diminuída com o passar dos dias analisados, passando de um consumo/preferência similar ao controle no início do experimento para muito abaixo dos níveis controle após 12 dias de teste. Em fêmeas, observou-se uma tendência entre linhagem e tratamento revelando que as ratas SHR estressado consumiram menos álcool durante o experimento do que a linhagem LEW. Outro fato importante a ser destacado é que novamente houve uma redução gradual do consumo do grupo SHR estressado apenas após o início do tratamento, demonstrando que os animais buscam a solução com etanol pela novidade, da mesma forma que o grupo controle, mas após perceberam que a novidade tem sabor desagradável/aversivo, deixam de consumir a solução, talvez devido aos estímulos aversivos apresentados aos animais durante o protocolo de estresse.

No entanto, o protocolo com 28 dias de estresse (VARIm-28d), caracterizado por estresse variado e que usualmente é utilizado pela literatura para induzir depressão, apesar de não ter causado alterações comportamentais no LCE (aumento da ansiedade), promoveu aumento no consumo de álcool na linhagem SHR (apenas em machos), mas não na LEW (de ambos os sexos). Por se tratar de um protocolo de estresse longo, é possível que tenha ocorrido subsensibilidade (*downregulation*) dos receptores de glicocorticóides, causando prejuízo no *feedback* negativo e, conseqüentemente, fazendo com que o aumento de dopamina no núcleo *accumbens* não retorne ao seu estado basal (Piazza & Le Moal, 1998). Assim, este estresse crônico estaria causando sensibilização das vias de recompensa cerebral, o poderia explicar o aumento de consumo no protocolo de estresse crônico. Apesar de dados controversos em relação as linhagens SHR e LEW e seu consumo de álcool, a linhagem SHR parece ser mais suscetível ao estresse, aumentando o consumo de etanol, e a não ocorrência deste efeito no protocolo de 10 dias (IMOB-10d e VARI-10d) pode ser justificada pelo pouco tempo de exposição ao estresse (apenas 10 dias) o que não chegaria a causar alterações

neuromorfológicas nas vias responsáveis pelo abuso de drogas nos ratos e, consequentemente, não resultaria em aumento do consumo de etanol. Em adição, Izidio (2005) comenta a ocorrência de aumento do consumo de álcool em animais SHR após receberem a administração oral diária de uma droga (procedimento considerado estressante), o que não ocorreu nos animais da linhagem LEW.

Nossos resultados corroboram dados prévios de nosso laboratório que mostram a linhagem SHR como mais suscetível ao consumo de álcool após a exposição a um estresse crônico (Lach et al., 2006), em relação a outras linhagens. A este respeito, Smith e colaboradores (1996) evidenciaram redução da preferência ao etanol em ratos Wistar usando um protocolo de estresse similar ao utilizado no presente estudo.

Em resumo, em relação ao consumo de/preferência por etanol, nossos dados demonstram utilizando linhagens com comportamentos contrastantes para ansiedade, protocolos de estresse diversificados e consumo de álcool, é que características relacionadas à ansiedade parecem não determinar o grau de consumo de álcool já que o uso de linhagens mais ‘ansiosas’ e protocolos de estresse que promovem estados elevados de ansiedade não foram capazes de elevar o consumo de etanol pelos animais. Os resultados confirmam e corroboram, portanto, o estudo de Langen & Fink (2004) que aponta que outros fatores comportamentais, que não somente a ansiedade, podem influenciar o consumo de álcool.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que as linhagens utilizadas em nosso experimento mantêm os traços contrastantes para ansiedade e consumo de álcool descrito na literatura, mesmo após eventos estressantes, embora o protocolo de estresse utilizado seja fundamental para promover tais alterações.

Observamos também que o protocolo de estresse com características previsíveis e bastante severa (IMOB-10d) promoveu aumento da ansiedade inata (primeira exposição) nas linhagens LEW e SHR, mas esse mesmo protocolo não permitiu que a ansiedade condicionada (segunda exposição) se instalasse, sugerindo que a promoção do estado ansioso intenso do animal na primeira exposição (inato) inviabiliza um aumento da ansiedade por estímulos subsequentes (condicionada).

Por outro lado, a principal alteração observada no consumo de álcool, ocorreu com um protocolo de estresse previsível, prolongado e moderado (VARIm-28d) e apenas em machos SHR, sugerindo que as neuroadaptações envolvidas com consumo de álcool tendem a ser de longo prazo e dependem da susceptibilidade da linhagem usada.

De uma maneira geral, os animais LEW e SHR sofreram os efeitos do estresse da mesma forma em relação aos comportamentos relacionados à ansiedade, com uma leve tendência para SHR, especialmente fêmeas, a serem mais sensíveis aos efeitos do estresse. No entanto, em relação ao consumo de etanol, apenas a linhagem SHR, especialmente os machos, foram sensíveis em aumentar o consumo após exposição ao estresse, sugerindo que, dependendo do protocolo experimental apresentado após as situações de estresse, as diferenças entre LEW e SHR quanto à sensibilidade ao estresse podem ser muito evidentes.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Adamec, R.E.; Burton, P.; Shallow, T.; Budgell, J. (1999) **Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle--effective hemisphere depends on the behavior.** *Physiol Behav* 65(4-5): 739-51.
- Allen, J.P.; Allen, C.F. (1974) **Role of the amygdaloid complexes in the stress-induced release of ACTH in the rat.** *Neuroendocrinology* 15(3-4): 220-30.
- Anseloni, V.Z.; Motta, V.; Lima, G.; Brandão, M.L. (1995) **Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls.** *Braz J Med Biol Res* 28 (5): 567-601.
- Armario, A.; Gavalda, A.; Marti, J. (1995) **Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats.** *Psychoneuroendocrinology* 20(8): 879-90.
- Baker, S.L.; Kentner, A.C.; Konkle, A.T.; Santa-Maria Barbagallo, L.; Bielajew, C. (2006) **Behavioral and physiological effects of chronic mild stress in female rats.** *Physiol Behav* 87(2): 314-22.
- Beck, K.D.; Luine, V.N. (2002) **Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: role of housing conditions.** *Physiol Behav* 75: 661-73.
- Bekris. B.; Antoniou, K.; Daskas, S.; Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005) **Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains.** *Behav Brain Res* 161: 45-59.
- Bertoglio, L.J., Carobrez, A.P., (2000) **Previous maze experience required to increase open arm avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety.** *Behav Brain Res* 108: 197-203.
- Bertoglio, L.J.; Carobrez, A.P. (2002) **Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze.** *Pharmacol Biochem Behav* 73(4): 963-9.



- Bertoglio, L.J.; Carobrez, A.P. (2006) **Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on.** *Neurosc Biobehav Rev* 29: 1193–1205.
- Berton, O.; Aguerre, S.; Sarrieau, A.; Mormede, P.; Chaouloff, F. (1998) **Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats.** *Neuroscience* 82(1): 147-59.
- Bielajew, C.; Konkle, A.T.M.; Merali, Z. (2002) **The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats I. Biochemical and physiological analyses.** *Behav Brain Res* 136: 583-592.
- Bowman, R.E.; Beck, K.D.; Luine, V.N. (2003) **Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity.** *Horm. Behav.* 43: 48–59.
- Brandão, M.L.; Melo, L.L.; Cardoso, S.H. (1993) **Mechanisms of defense in the inferior colliculus.** *Behav Brain Res.* 58: 49-55.
- Brunell, S.C. & Spear, L.P. (2005) **Effect of stress on the voluntary intake of a sweetened ethanol solution in pair-housed adolescent and adult rats.** *Alcohol Clin Exp Res* 29(9):1641-53.
- Calogero, A.E.; Sternberg, E.M.; Bagdy, G.; Smith, C.; Bernardini, R.; Aksentijevich, S.; Wilder, R.L.; Gold, P.W.; Chrousos, G.P. (1992) **Neurotransmitter-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness is defective in inflammatory disease-susceptible Lewis rats: *in vivo* and *in vitro* studies suggesting globally defective hypothalamic secretion of corticotropin-releasing hormone.** *Neuroendocrinology* 55(5): 600-8.
- Calzavara, M.B.; Lopez, G.B.; Abilio VC, Silva RH, Frussa-Filho R. (2004) **Role of anxiety levels in memory performance of spontaneously hypertensive rats.** *Behav Pharmacol* 15(8): 545-53.
- Camp, D.M.; Browman, K.E.; Robinson, T.E. (1994) **The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in ventral striatum of Lewis versus Fischer 344 rats.** *Brain Res* 668: 180-193.
- Cappell, H.; Herman, C.P. (1972) **Alcohol and tension reduction. A review.** *Q J Stud Alcohol* 33(1): 33-64.

Carlson, N.R. **Fisiologia do comportamento**. 2.ed. Manole, Barueri. 2002.

Castro, F.R.; Farias, A.S.; Proenca, P.L.; de La Hoz, C.; Langone, F.; Oliveira E.C.; Toyama MH, Marangoni S, Santos LM. (2006) **The effect of treatment with crotapotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats**. *Toxicon*. 49(3): 299-305.

Cenci, M.A.; Kalen, P.; Mandel, R.J.; Bjoerklund, A. (1992) **Regional differences in the regulation of dopamine and noradrenaline release in medial frontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen: A microdialyses study in the rat**. *Brain Res* 581: 217-228.

Charmandari, E.; Tsigos , C.; Chrousos, G. (2005) **Endocrinology of the stress response**. *Annu Rev Physio*. 67:259-84.

Checkley, S. (1996) **The neuroendocrinology of depression and chronic stress**. *Br Med Bull* 52: 597-617.

Cloninger CR. (1987) **Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism**. *Science* 236(4800): 410-6.

Colombo, G.; Agabio, R.; Lobina, C.; Reali, R.; Zocchi, A.; Fadda, F.; Gessa, G.L. (1995) **Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety**. *Physiol Behav*. 57(6):1181-5.

Conrad, C.D.; LeDoux, J.E.; Magarinos, A.M.; McEwer, B.C. (1999) **Repetead restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy**. *Behav Neurosci* 113: 902-913.

Cordero, M.I.; Rodriguez, J.J.; Davies, H.A.; Peddie, C.J.; Sandi, C.; Stewart, M.G. (2005) **Chronic restraint stress down-regulates amygdaloid expression of polysialylated neural cell adhesion molecule**. *Neuroscience* 133: 903–910.

Crabbe, J.C.; Wahlsten, D.; Dudek, B.C. (1999) **Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment**. *Science* 284(5420): 1670-2.

Dalla, C.; Antoniou, K.; Drossopoulou, G.; Xagoraris, M.; Kokras, N.; Sfikakis, A.; Papadopoulou-Daifoti, Z. (2005) **Chronic mild stress impact: are females more vulnerable?** *Neuroscience* 135(3): 703-14.

Da Silva, G.E., Ramos, A., Takahashi, R.N. (2004) **Acquisition of ethanol self-administration in two rat lines used as genetic models of anxiety.** *Braz J Med Biol Res* 37: 1511–1517.

Da Silva, G.E.; Vendruscolo, L.F.; Takahashi, R.N. (2005) **Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats** *Life Sciences* 77: 693–706

Davis M. (1992) **The role of the amygdala in fear and anxiety.** *Annu Rev Neurosci* 15: 353-75.

Davis, M.; Rainnie, D.; Cassel, M. (1994) **Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety.** *Trends Neurosci* 17(5): 208-14.

De Kloet, E.R.; Joels, M.; Holsboer, F. (2005) **Stress and the brain: from adaptation to disease.** *Nat Rev Neurosci* 6(6): 463-75.

Deroche, V.; Piazza, P.V.; Maccari, S.; Le Moal, M.; Simon, H. (1992) **Repeated corticosterone administration sensitizes the locomotor response to amphetamine.** *Brain Res* 584(1-2):309-13.

Fahlke, C. & Hansen, S. (1999) **Effect of local intracerebral corticosterone implants on alcohol intake in the rat.** *Alcohol Alcohol* 34(6): 851-61.

Faraday, M.M. (2002) **Rat sex and strain differences in response to stress.** *Physiol. Behav* 75: 507-522.

Fernandez-Teruel, A.; Driscoll, P.; Gil, L.; Aguilar, R.; Tobena, A.; Escorihuela, R.M. (2002) **Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior.** *Pharmacol Biochem Behav* 73(1):225-31.

File, S.E, Zangrossi, H.Jr. (1993) **"One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state?** *Psychopharmacology* 110(1-2): 240-244.

- File, S.E.; Gonzalez, L.E.; Gallant, R. (1998) **Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia.** *Neuropsychopharmacology* 19(5): 397-405.
- Foroud, T. & Li, TK. (1999) **Genetics of alcoholism: a review of recent studies in human and animal models.** *Am J Addict* 8(4): 261-78.
- Fujita, S.; Okutsu, H.; Yamaguchi, H.; Nakamura, S.; Adachi, K.; Saigusa, T.; Koshikawa, N. (2003) **Altered pre- and postsynaptic dopamine receptor functions in spontaneously hypertensive rat: an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder.** *J Oral Sci* 45(2): 75-83.
- Galea, L.A.; McEwen, B.S.; Tanapat, P.; Deak, T.; Spencer, R.L.; Dhabhar, F.S. (1997) **Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress.** *Neuroscience* 81(3):689-97.
- Gameiro, G.H.; Gameiro, P.H.; Andrade Ada, S.; Pereira, L.F.; Arthuri, M.T.; Marcondes, F.K.; Veiga, M.C. (2006) **Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress.** *Physiol Behav* 87(4):643-9.
- Gentsch, C.; Lichtsteiner, M.; Feer, H. (1987) **Open field and elevated plus-maze: a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide.** *Behav Brain Res* 25(2): 101-7.
- Gingras, M.A. & Cools, A.R. (1996) **Analysis of the biphasic locomotor response to ethanol in high and low responders to novelty: a study in Nijmegen Wistar rats.** *Psychopharmacology* 125(3): 258-64.
- Glowa, J.R.; Sternberg, E.M.; Gold, P.W. (1992) **Differential behavioral response in LEW/N and F344/N rats: effects of corticotropin releasing hormone.** *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 16: 549-560.
- Godinho, M.A.A. **Nível de luminosidade entre os braços fechados do labirinto em cruz elevado: Uma alternativa para melhorar a validade de predição do modelo.** 2007, 62f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- Goeders, N.E. (2002) **Stress and cocaine addiction.** *J Pharmacol Exp Ther* 301(3): 785-9.

- Goeders, N.E. & Guerin, G.F. (1996) **Role of corticosterone in intravenous cocaine self-administration in rats.** *Neuroendocrinology* 64(5): 337-48.
- Gonzalez, L.E.; File, S.E. (1997) **A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus.** *J Neurosci* 17(4): 1505-11.
- Goto, S.H.; Conceição, I.M.; Ribeiro, R.A.; Frussa-Filho R. (1993) **Comparison of anxiety measured in the elevated plus-maze, open-field and social interaction tests between spontaneously hypertensive rats and Wistar EPM-1 rats.** *Braz J Med Biol Res* 26(9):965-9.
- Graeff, F.G. (Ed.). **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação.** São Paulo, Edusp, 1984.
- Graeff, F.G. (1994) **Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behavior and related emotions in mammals.** *Braz J Med Biol Res* 27: 811-829.
- Gray, J. A. **The neuropsychology of anxiety.** Oxford University Press, Oxford, U.K., 1982.
- Haile, C.N.; GrandPre, T.; Kosten, T.A. (2001) **Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats.** *Psychopharmacology (Berl)* 154(2): 213-20.
- Haller, J. (2001) **The link between stress and the efficacy of anxiolytics. A new avenue of research.** *Physiol Behav* 73: 337-42.
- Hendley, E. D. & Ohlsson, W.G. (1991) **Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats.** *Am J Physiol.* 261(2 Pt 2):H583-9.
- Handley, S.L.; McBlane, J.W. (1993) **An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs.** *J Pharmacol Toxicol Methods* 29: 129-138.
- Henniger, M.S.; Spanagel, R.; Wigger, A.; Landgraf, R.; Holter, S.M. (2002) **Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior.** *Neuropsychopharmacology* 26(6):729-36.

- Hinojosa, F.R.; Spricigo, L. Jr.; Izidio, G.S.; Bruske, G.R.; Lopes, D.M.; Ramos, A. (2006) **Evaluation of two genetic animal models in behavioral tests of anxiety and depression.** *Behav Brain Res* 168(1): 127-36.
- Hiroi, N. & Agatsuma, S. (2005) **Genetic susceptibility to substance dependence.** *Mol Psychiatry* 10(4): 336-44.
- Hodges, H.; Green, S.; Glenn, B. (1987) **Evidence that the amygdala as involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not discrimination.** *Psychopharmacology* 92: 491-504.
- Holmes, A. & Rodgers, R.J. (1998) **Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state?** *Pharmacol Biochem Behav* 60(2):473-88.
- Imperato, A. & Di Chiara, G. (1986) **Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol.** *J Pharmacol Exp Ther* 239(1): 219-28.
- Izídio, G. S. **A influência de fatores genéticos e ambientais em modelos animais de ansiedade e sua relação com um modelo de alcoolismo.** 2005. 142f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- Izidio, G.S.; Spricigo, L. Jr.; Ramos, A. (2005) **Genetic differences in the elevated plus-maze persist after first exposure of inbred rats to the test apparatus.** *Behav Processes* 68(2): 129-34.
- Kalivas, P.W. & Stewart J. (1991) **Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity.** *Brain Res Brain Res Rev* 16(3): 223-44.
- Kessler, R.C.; McGonagle, K.A.; Zhao, S.; Nelson, C.B.; Hughes, M.; Eshleman, S.; Wittchen, H.U.; Kendler, K.S. (1994) **Lifetime and 12 month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States: results from the national comorbidity survey.** *Arch Gen Psychiatric* 51: 8-9.
- Kirby, R.F.; Callahan, M.F.; McCarty, R. Johnson, A.K. (1989) **Cardiovascular and sympathetic nervous system responses to an acute stressor in borderline hypertensive rats (BHR).** *Physiol Behav* 46(2): 309-13.

- Koob, G.F. & Le Moal, M. (1997) **Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation.** *Science* 278: 52-58.
- Koob, G.F. & Le Moal, M. (2001) **Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis.** *Neuropsychopharmacology* 24(2): 97-129.
- Koolhaas, J.M.; Korte, S.M.; De Boer, S.F.; Van Der Vegt, B.J.; Van Reenen, C.G.; Hopster, H.; De Jong, I.C.; Ruis, M.A.; Blokhuis, H.J. (1999) **Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology.** *Neurosci Biobehav Rev* 23(7):925-35.
- Kosten, T.A.; Miserendino, M.J.; Chi, S.; Nestler, E.J. (1994) **Fischer and Lewis rat strains show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion.** *J Pharmacol Exp Ther* 269(1): 137-44.
- Kosten, T.A.; Miserendino, M.J.; Kehoe, P. (2000) **Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience.** *Brain Res* 875(1-2): 44-50.
- Lach, G.; Pereira, E.; De Lima, T.C.M.; Ramos, A. **Influência do estresse crônico moderado no consumo de etanol de ratos wistar e SHR.** In: FeSBE, XXI, 2006, Águas de Lindóia.
- Langen, B. & Fink, H. (2004) **Anxiety as a predictor of alcohol preference in rats?** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(6):961-8.
- LeDoux, J.E. (1994) **The amygdala: contributions to fear and stress.** *Semin Neurosci* 6: 231-237.
- Ledoux, J.E. & Muller, J. (1997) **Emotional memory and psychopathology.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352(1362): 1719-26.
- Lesch, K.P. (2001) **Mouse anxiety: the power of knockout.** *Pharmacogenomics J* 1(3): 187-92.
- Magarinos, A.M. & McEwen, B.S. (1995) **Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors.** *Neuroscience* 69(1): 83-8.
- Matuszewich, L.; Karney, J.J.; Carter, S.R.; Janasik, S.P.; O'Brien, J.L.; Friedman, R.D. (2007) **The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures.** *Physiol & Behav* 90(4): 674-81.

- McEwen, B.S. & Sapolsky, R.M. (1995) **Stress and cognitive function.** *Curr Opin Neurobiol* 5(2): 205-16.
- McEwen, B.S. (1999) **Stress and hippocampal plasticity.** *Annu Rev Neurosci* 22: 105-22.
- McEwen, B.S. (2002) **The neurobiology and neuroendocrinology of stress. Implications for post-traumatic stress disorder from a basic science perspective.** *Psychiatr Clin North Am* 25(2): 469-94.
- McNiven, E.; de Catanzaro, D.; Younglai, E.V. (1992) **Chronic stress increases estrogens and others steroids in inseminated rats.** *Physiol.Behav.* 52: 159-162.
- Mechiel Korte, S. & De Boer, S.F. (2003) **A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze.** *Eur J Pharmacol* 463(1-3): 163-75.
- Melia, K.R.; Ryabinin, A.E.; Schroeder, R.; Bloom, F.E.; Wilson, M.C. (1994) **Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress.** *J Neurosci* 14:5929-5938.
- Melo, L.L.; Cardoso, S.H.; Brandão, M.L. (1992) **Antiaversive action of benzodiazepines on scape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus.** *Physiol Behav* 51: 557-562.
- Mello, N.K. & Mendelson, J.H. (1997) **Cocaine's effects on neuroendocrine systems: clinical and preclinical studies.** *Pharmacol Biochem Behav* 57(3): 571-99.
- Meneses, A. & Hong, E. (1998) **Spontaneously hypertensive rats: a potential model to identify drugs for treatment of learning disorders.** *Hypertension* 31(4): 968-72.
- Mitra, R.; Vyas, A.; Chatterjee, G.; Chattarji, S. (2005) **Chronic-stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats.** *Neurosci Lett* 383(3): 278-83.
- Monteiro, S.; Fuentes, J.A.; Fernandez-Tome, P. (1990) **Lesions of the ventral noradrenergic bundle prevent the rise in blood pressure induced by social deprivation stress in the rat.** *Cellular and Molecular Neurobiology* 10: 497-505.



- Mormede, P.; Moneva, E.; Bruneval, C.; Chaoulouff, F.; Moisan, M.P. (2002) **Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD.** *Genes Brain Behav* 1(2): 111-6.
- Nestler, E.J. (1992) **Molecular mechanisms of drug addiction.** *J Neurosci* 12(7): 2439-50.
- Nestler, E.J. & Aghajanian, G.K. (1997) **Molecular and cellular basis of addiction.** *Science* 278: 58-63.
- Nestler, E.J.; Barrot, M.; DiLeone, R.J.; Eisch, A.J.; Gold, S.J.; Monteggia, L.M. (2002) **Neurobiology of depression.** *Neuron* 34(1): 13-25.
- Okamoto, K. & Aoki K. (1963) **Development of a strain of spontaneously hypertensive rats.** *Jpn Circ J* 27: 282-93.
- Ortiz, J.; Fitzgerald, L.W.; Lane, S.; Terwilliger, R.; Nestler, E.J. (1996) **Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress.** *Neuropsychopharmacology* 14: 443–452.
- Ossenkopp, K.P.; Sorenson, L.; Mazmanian, D.S. (1994) **Factor analysis of open-field behavior in the rat (*Rattus norvegicus*): application of the three-way PARAFAC model to a longitudinal data set.** *Behav Processes* 31: 129-144.
- Padovan, C.M. & Guimarães, F.S. (2000) **Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus maze.** *Braz. J. Med. Biol. Res* 33(1): 79-83.
- Papp, M.; Gruca, P.; Boyer, P.A.; Mocaër, E. (2003) **Effect of Agomelatine in the Chronic Mild Stress Model of Depression in the Rat.** *Neuropsychopharmacology* 28: 694–703.
- Pawlak, R.; Magarinos, A.M.; Melchor, J.; McEwen, B.; Strickland, S. (2003) **Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior.** *Nat Neurosci* 6(2): 168-74.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.; Briley, M. (1985) **Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in rat.** *J Neurosci Meth* 14: 149-167.

- Perrot-Sinal, T.S.; Gregus, A.; Boudreau, D.; Kalynchuk, L.E. (2004) **Sex and repeated restraint stress interact to affect cat odor-induced defensive behavior in adult rats.** *Brain Res* 1027(1-2): 161-72.
- Piazza, P.V.; Deminiere, J.M.; Le Moal, M.; Simon, H. (1990) **Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration.** *Brain Res* 514(1): 22-6.
- Piazza, P.V. & Le Moal, M.L. (1996) **Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 359-78.
- Piazza, P.V. & Le Moal, M. (1998) **The role of stress in drug self-administration.** *Trends Pharmacol Sci* 19(2): 67-74.
- Piazza, P.V.; Rouge-Pont, F.; Deroche, V.; Maccari, S.; Simon, H.; Le Moal, M. (1996) **Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission.** *Proc Natl Acad Sci USA* 93(16): 8716-20.
- Pohorecky, L.A. (1990) **Interaction of ethanol and stress: research with experimental animals--an update.** *Alcohol Alcohol* 25(2-3): 263-76.
- Prasad, B.M.; Ulibarri, C.; Sorg, B.A. (1998) **Stress-induced cross-sensitization to cocaine: effect of adrenalectomy and corticosterone after short- and long-term withdrawal.** *Psychopharmacology* 136(1): 24-33.
- Pratt, J.A. (1992) **The neuroanatomical basis of anxiety.** *Pharmacol Ther* 55: 149-181.
- Przegalinski, E.; Filip, M.; Siwanowicz, J.; Nowak, E. (2000) **Effect of adrenalectomy and corticosterone on cocaine-induced sensitization in rats.** *J Physiol Pharmacol* 51(2):193-204.
- Ramos, A.; Berton, O.; Mormede, P.; Chaouloff, F. (1997) **A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains.** *Behav Brain Res* 85(1): 57-69.
- Ramos, A.; Mellerin, Y.; Mormede, P.; Chaouloff, F. (1998) **A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses.** *Behav. Brain Res* 96: 195-205.

- Ramos, A.; Kangerski, A.L.; Basso, P.F.; Da Silva Santos, J.E.; Assreuy, J.; Vendruscolo, L.F.; Takahashi, R.N. (2002) **Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain.** *Behav Brain Res* 129(1-2): 113-23.
- Rockman, G.E.; Hall, A.; Glavin, G.B. (1986) **Effects of restraint stress on voluntary ethanol intake and ulcer proliferation in rats.** *Pharmacol Biochem Behav* 25(5): 1083-7.
- Rodgers, R.J.; Lee, C.; Shepherd, J.K. (1992) **Effects of diazepam on behavioral and antinociceptive responses to the elevated plus-maze experience.** *Psychopharmacology* 106: 102-10.
- Rodgers, R.J. & Shepherd, J.K. **Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice.** *Psychopharmacology (Berl)*. 113(2):237-42.
- Rodgers, R.J.; Cole, J.C. (1994) **Anxiolytic-like effect of (S)-WAY 100135, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze test.** *Eur J Pharmacol* 261(3): 321-5.
- Rodgers, R.J.; Johnson, N.J.; Cole, J.C.; Dewar, C.V.; Kidd, G.R.; Kimpson, P.H. (1996) **Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trail 1 and response to post-trail cholinergic receptor blockade.** *Pharmacol Biochem Behav* 54(1): 41-50.
- Rodgers, R.J.; Cao, B.J.; Holmes, A. (1997) **Animal models of anxiety: an ethological perspective.** *Braz J Med Biol Res* 30: 204-299.
- Rogan, M.T. & LeDoux, J.E. (1996) **Emotion: systems, cells, synaptic plasticity.** *Cell* 85(4): 469-75.
- Rouge-Pont, F.; Marinelli, M.; Le Moal, M.; Simon, H.; Piazza, P.V. (1995) **Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion.** *J Neurosci* 15(11): 7189-95.
- Rupniak, N.M.; Carlson, E.C.; Harrison, T.; Oates, B.; Seward, E.; Owen, S.; de Felipe, C.; Hunt, S.; Wheeldon, A. (2000) **Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1))**

**receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice.** *Neuropharmacology* 39(8): 1413-21.

Sagvolden, T.; Metzger, M.A.; Schiorbeck, H.K.; Rugland, A.L.; Spinnangr, I.; Sagvolden, G. (1992) **The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants.** *Behav Neural Biol* 58(2): 103-12.

Sagvolden, T.; Pettersen, M.B.; Larsen, M.C. (1993) **Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior compared to four other rat strains.** *Physiol Behav* 54(6): 1047-55.

Sandi, C.; Merino, J.J.; Cordero, M.I.; Touyarot, K.; Venero, C. (2001) **Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1.** *Neuroscience* 102: 329-339.

Sapolsky, R.M. (1986) **Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels.** *J Neurosci* 6(8): 2240-4.

Selye, H. (1936) **A syndrome produce by diverse nocuos agents.** *Nature* 138: 32.

Schmitt, P.; Canive, P.; Di Scala, G.; Jenck, F.; Brandão, M.L.; Bagri, A.; Moreau, J.L.; Sandner, G. (1986) **A neuropharmacological study of the periventricular neural substract involved in flight.** *Behav Brain Res* 22: 181-190.

Schuckit, M.A. (1994) **Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism.** *Am J Psychiatry* 151: 184-189.

Shors, T.J. & Mathew, P.R. (1998) **NMDA receptor antagonism in the lateral/basolateral but not central nucleus of the amygdala prevents the induction of facilitated learning in response to stress.** *Learn Mem* 5(3):220-30.

Sinha R. (2001) **How does stress increase risk of drug abuse and relapse?** *Psychopharmacology* 158(4): 343-59.

Smith, J.W.; Remy, S.M.; Schreiber, R.; De Vry, J. (1996) **Chronic mild stress causes a decrease in the preference for low ethanol concentrations in male Wistar rats.** *Eur Neuropsychopharmacology* 6(4): S4/131-S4/131.

- Spanagel, R.; Montkowski, A.; Allingham, K.; Stohr, T.; Shoaib, M.; Holsboer, F.; Landgraf, R. (1995) **Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats.** *Psychopharmacology* 122(4): 369-73.
- Starkman, M.N.; Gebarski, S.S.; Berent, S.; Schteingart, D.E. (1992) **Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome.** *Biol Psychiatry* 32(9): 756-65.
- Starkman, M.N.; Giordani, B.; Gebarski, S.S.; Berent, S.; Schork, M.A.; Schteingart, D.E. (1999) **Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease.** *Biol Psychiatry* 46(12): 1595-602.
- Sternberg, E.M.; Glowa, J.R.; Smith, M.A.; Calogero, A.E.; Listwak, S.J.; Aksentijevich, S.; Chrousos, G.P.; Wilder, R.L.; Gold, P.W. (1992) **Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats.** *Brain Res* 570(1-2): 54-60.
- Stohr, T.; Szuran, T.; Pliska, V.; Feldon, J. (1990) **Behavioural and hormonal differences between two Lewis rat lines.** *Behav Brain Res* 101(2):163-72.
- Suzuki, T.; Otani, K.; Koike, Y.; Misawa, M. (1988a) **Genetic differences in preferences for morphine and codeine in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains.** *Jpn J Pharmacol* 47(4): 425-31.
- Suzuki, T.; George, F.R.; Meisch, R.A. (1988b) **Differential establishment and maintenance of oral ethanol reinforced behavior in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains.** *J Pharmacol Exp Ther* 245(1): 164-70.
- Takahashi, R.N.; Berton, O.; Mormede, P.; Chaouloff, F. (2001) **Strain-dependent effects of diazepam and the 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor antagonist SB 206553 in spontaneously hypertensive and Lewis rats tested in the elevated plus-maze.** *Braz J Med Biol Res* 34(5): 675-82.
- Tanaka M. (1998) **Stress and alcohol: research with experimental animals** *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 33(1):31-43.

- Tanapat, P.; Hastings, N.B.; Reeves, A.J.; Gould, E. (1999) **Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat.** *J Neurosci* 19(14):5792-801.
- Terenina-Rigaldie, E.; Jones, B.C.; Mormede, P. (2003a) **Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats.** *Genes Brain Behav* 2(3): 125-31.
- Terenina-Rigaldie, E.; Moisan, M.P.; Colas, A.; Beauge, F.; Shah, K.V.; Jones, B.C.; Mormede, P. (2003b) **Genetics of behaviour: phenotypic and molecular study of rats derived from high- and low-alcohol consuming lines.** *Pharmacogenetics* 13(9): 543-54.
- Tomaz, C.; Dickinson-Anson, H.; McGauch, J.L.; Souza-Silva, M.A.; Viana, M.B.; Graeff, F.G. (1993) **Localization in the amygdala of the amnestic effect of diazepam on emotional memory.** *Behav Brain Res* 58: 99-106.
- Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. (1993) **Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze.** *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44: 463-469.
- Trindade, A.A. **Estudo da relação entre sensibilização comportamental ao etanol e estresse de restrição de movimentos: associação com níveis de corticosterona.** (2006) Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.
- Trullas, R. & Skolnick, P. (1993) **Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains.** *Psychopharmacology* 111(3): 323-31.
- Uno, H.; Tarara, R.; Else, J.G.; Suleman, M.A.; Sapolsky, R.M. (1989) **Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates.** *J Neurosci* 9(5): 1705-11.
- van der Staay, F. J. (2006) **Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy.** *Brain Res Rev* 52: 131–159.
- van Erp, A.M.M & Miczek, K.A. (2001) **Persistent suppression of ethanol self-administration by brief social stress in rats and increased startle response as index of withdrawal.** *Physiol Behav* 73: 301-11.

- Vasconcellos, A.P.S. **Avaliação da atividade neuroprotetora e antidepressiva do tratamento do com lítio em um modelo de estresse crônico variado.** 2005. 263f. Tese (Doutorado em Neurociências) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- Vendruscolo, L.F.; Takahashi, R.N.; Bruske, G.R.; Ramos, A. (2003) **Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors.** *Psychopharmacology* 170(3): 287-93.
- Vendruscolo, L.F.; Terenina-Rigaldie, E.; Raba, F.; Ramos, A.; Takahashi, R.N.; Mormède, P. (2005) **Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats.** *Genes, Brain and Behav* 5(6):441-50.
- Vendruscolo, L.F.; Vendruscolo, J.C.M.; Terenina-Rigaldie, E.; Raba, F.; Ramos, A.; Takahashi, R.N.; Mormède, P. (2006) **Genetic influences on behavioral and neuroendocrine responses to predator-odor stress in rats.** *Neurosci Lett* 409: 89-94.
- Volpicelli, J.R & Ulm, R.R. (1990) **The influence of control over appetitive and aversive events on alcohol preference in rats.** *Alcohol* 7:133-6.
- Vyas, A.; Mitra, R.; Shankaranarayana Rao, B.S.; Chattarji, S. (2002) **Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons.** *J Neurosci* 22(15): 6810-8.
- Vyas, A. & Chattarji, S. (2004) **Modulation of different states of anxiety-like behavior by chronic stress.** *Behav Neurosci* 118(6): 1450-4.
- Wand, G. (2005) **The anxious amygdala: CREB signaling and predisposition to anxiety and alcoholism.** *J Clin Invest.* 115(10):2697-9.
- Weiss, F.; Lorang, M.T.; Bloom, F.E.; Koob, G.F. (1993) **Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants.** *J Pharmacol Exp Ther* 267(1): 250-8.

Willner, P.; Towell, A.; Sampson, D.; Sophokleous, S.; Muscat R. (1987) **Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant.** *Psychopharmacology* 93: 358–64.

Willner, P. (2005) **Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS.** *Neuropsychobiology* 52(2):90-110.

Wood, G.E. & Shors, T.J. (1998) **Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones.** *Physiology* 95: 4066-4071.

Wood, G.E.; Young, L.T.; Reagan, L.P.; McEwen, B.S. (2003) **Acute and chronic restraint stress alter the incidence of social conflict in male rats.** *Horm Behav* 43: 205-213.

Yokoo, H.; Tanaka, M.; Yoshida, M.; Tsuda, A.; Tanaka, T.; Mizoguchi, K. (1990) **Direct evidence of conditioned fear-elicited enhancement of noradrenaline release in the rat hypothalamus assessed by intracranial microdialysis.** *Brain Res* 536: 305-308.